

Untersuchungen zur Epimerisierung und Transformation

von Ergotalkaloiden

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades
d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m
(Dr. rer. nat.)
im Fach Chemie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Dipl. Chem. Stefan Merkel

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Stefan Hecht, Ph.D.

Gutachter/innen: 1. Prof. Dr. Irene Nehls

2. Prof. Dr. Ulrich Panne

Datum der mündlichen Prüfung: 25.06.2013

Kurzzusammenfassung

Ergotalkaloide sind sekundäre Stoffwechselprodukte des parasitären Schlauchpilzes *Claviceps purpurea*. Dieser Pilz wächst auf Süßgräsern (*Poaceae*), zu denen auch Getreide zählt, und bildet dort Mutterkörner (Sklerotien). Durch Kontamination von Getreide mit Sklerotien können die in den Sklerotien enthaltenen Ergotalkaloide in Lebensmittel gelangen und durch den Verzehr schwerwiegende Krankheiten beim Menschen verursachen. Durch *C. purpurea* werden vorrangig sechs verschiedene Ergotalkaloid-Epimerenpaare gebildet, die toxischen C8-(*R*)-Epimere und die biologisch nicht relevanten C8-(*S*)-Epimere. Vor dem Hintergrund der Umwandlung der epimeren Formen ineinander, war es das Ziel der Arbeit, die Epimerisierung der Ergotalkaloide während der Probenvorbereitung im Vergleich zu bisher bekannten Probenaufbereitungsverfahren zu minimieren. Dieses gelang durch die Entwicklung einer neuartigen Probenvorbereitung, bei der auf den Zusatz starker Säuren oder Basen verzichtet wird. Zudem können aufgereinigte Extrakte bei Raumtemperatur über 96 Stunden epimerisierungsfrei in einer tensidischen Acetonitril-Wasser-Lösung gelagert werden. Die Probenaufarbeitung mit anschließender Auftrennung über die Hochleistungsflüssigchromatographie und fluorimetrischer Detektion (HPLC-FLD) wurde für Roggenmehl und Speiseöl validiert und auf diese Matrices angewendet. So konnten erstmals die Ergotalkaloidgehalte auch in Weizenkeimöl quantifiziert werden. Im zweiten Teil der Arbeit wurde das Epimerisierungsverhalten von Ergotalkaloiden bei Backversuchen und *in vitro* Verdauexperimenten untersucht. Aus Modellbackversuchen mit Keksen resultierte eine Verschiebung des Epimerengleichgewichtes auf die Seite der (*S*)-Epimere. Das angewendete *in vitro* Verdaumodell führte für die Ergotalkaloidepimerenpaare Ergotamin und Ergosin zu einer Verschiebung des Epimerengleichgewichtes auf die Seite der toxischen (*R*)-Epimere, wobei der Anteil von Ergosin und Ergotamin von 32 % auf 51 % bzw. von 35 % auf 55 % anstieg. Dagegen zeigten die Ergotalkaloide der Ergotoxingruppe eine Verschiebung des Epimerengleichgewichtes auf die Seite der (*S*)-Epimere. Durch weitere Experimente konnte gezeigt werden, dass diese, für die verschiedenen Ergotalkaloide unterschiedliche Richtung der Epimerisierung, nur im Darmsaft des *in vitro* Modells stattfindet. Der dritte Teil der Arbeit beschäftigt sich mit Ergotalkaloid-Konjugaten, die unter dem Einfluss von UV-Licht ($\lambda = 350 \text{ nm}$) entstehen. Es wurden sechs Ergotalkaloid-Fettsäure-Konjugate synthetisiert und in Sklerotien über die HPLC in Verbindung mit massenspektrometrischer Detektion nachgewiesen.

Abstract

Ergot alkaloids are secondary metabolites of the parasitic fungus *Claviceps purpurea*. This fungus can be found on true grasses (*Poaceae*) including cereals. *C. purpurea* forms black compact masses (sclerotia). Due to contamination of cereals with sclerotia, cereal based food might contain ergot alkaloids. A consumption of ergot alkaloid contaminated food can cause severe diseases, i.e. gangrene or paresis. *C. purpurea* forms six epimeric pairs of ergot alkaloids predominantly the toxic C8-(*R*)-epimers and the biologically inactive C8-(*S*)-epimers. In view of the fact that both epimeric forms can be transformed into one another, the objective of this work was to develop a novel sample preparation method that minimizes the epimerization rate compared to previously published methods. The presented sample preparation procedure minimizes epimerization of ergot alkaloids, as it operates without the addition of strong acidic or alkaline modifiers for matrix removal. After sample preparation, an ergot alkaloid containing extract in a sodium hexanesulfonate solution is obtained in which no epimerization after 96 hours was observed. Thus, the sample preparation allows extract storage at ambient temperature for prolonged HPLC analysis. This novel sample preparation followed by HPLC-fluorescence analysis was validated for the matrices rye flour and wheat germ oil and was applied for food samples. This is the first time that the ergot alkaloid content in wheat germ oil was quantified. The second part of this work was the study of the epimerization behaviour of ergot alkaloids during baking and *in vitro* digestion. Baking of cookies resulted in a shift of the epimeric ratio towards the (*S*)-epimers. The *in vitro* digestion showed an ergot alkaloid specific shift of the epimeric ratio. The initial percentage of the (*R*)-epimer increased for ergotamine and ergosine from 32 % to 51 % and 35 % to 35 %, respectively. In contrast, ergot alkaloids of the ergotoxine type showed an epimeric shift towards their (*S*)-epimers. Further experiments indicated that the selective epimerization of ergotamine and ergosine occurs in the duodenal juice only. The third part of this work was the study of ergot alkaloid derivatives that are formed in combination with UV-light ($\lambda = 350$ nm). Six different ergot alkaloid fatty acid derivatives were synthesized and detected in sclerotia using a HPLC-MS/MS method.

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und mich bei meiner Promotion unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. Irene Nehls für die freundliche und vertrauensvolle Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit. Ebenso danke ich meinem Gutachter Prof. Dr. Panne für die Unterstützung und die Begutachtung meiner Arbeit. Des Weiteren bedanke ich mich bei meinen Betreuern Dr. Matthias Koch und Dr. Robert Köppen für die zahlreichen Ideen, fachlichen Diskussionen und konstruktiven Gespräche. Bei Tatjana Rasenko möchte ich mich bedanken für die Unterstützung und die angenehme Atmosphäre im Labor.

Für die fruchtbaren Diskussionen, guten Ideen und die schöne Zeit möchte ich mich bei meinen Büro-Kollegen Janine Richter, Susanne Esslinger, Dominic Ammann, Susanne Lischka, Dr. Sebastian Schmidt, Carolina Hamers-Allin, Sarah Drzymala, Svenja Schloss, Elena Schütz, Katrin Kittler und Bettina Mönch bedanken. Ein besonderer Dank für die schöne Zeit an der BAM geht an meine Kollegen Jonas Schenk, Paul Kuhlich, Mandy Hecht und Dr. David Siegel. Ein großer Dank geht auch an die von mir betreuten Praktikantinnen Lena Ruhe und Sabrina Diehn. Ganz besonders möchte ich mich bei Baha Dib für die ausgezeichnete Arbeit bei den *in vitro* Verdauexperimenten bedanken. Ein großer Dank geht auch an Dr. Ronald Maul für die zahlreichen guten Ideen und die sehr konstruktiven Diskussionen. Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Franziska Emmerling für die Messung zahlreicher Kristalle mittels Einkristallstrukturanalyse. Des Weiteren bedanke ich mich bei Dr. Christine Schwake-Anduschus vom Max Rubner-Institut für die Bereitstellung von Mehl- und Brotproben. Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Karsten Andrae, Dr. Marcus Weber und Vedat Durmaz für die am Konrad-Zuse-Zentrum für Informationstechnik Berlin durchgeführten Berechnungen. Ich bedanke mich bei den Kolleginnen und Kollegen der Fachgruppe 1.23 bzw. 1.7 der Bundesanstalt für Materialforschung und Prüfung für eine sehr angenehme Promotionszeit und die vielfältige Unterstützung.

Ein herzlicher Dank geht nicht zuletzt an meine Familie für ihre Unterstützung und ihr Verständnis, insbesondere an meine Frau Roswitha, an die Familie meines Bruders und an meine Eltern.

Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung	I
Abstract	II
Danksagung	III
Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
1.1 Vorkommen und Lebenszyklus des Pilzes <i>Claviceps purpurea</i>	1
1.2 Struktur von Ergotalkaloiden	2
1.3 Historischer Hintergrund zum Mutterkorn und Wirkungsweise von Ergotalkaloiden ..	4
2 Grundlagen	7
2.1 Epimerisierung am C8-Kohlenstoffatom	7
2.2 Derivate von Ergotalkaloiden.....	8
2.3 Gesetzliche Regelungen	12
2.4 Ergotalkaloidgehalte in Mehl	13
2.5 Abbau- und Epimerisierungsverhalten von Ergotalkaloiden bei der Verarbeitung von Getreide	14
2.6 Strukturelle Charakterisierung von Ergotalkaloiden	15
2.7 Analysenverfahren zur epimerenspezifischen Quantifizierung von Ergotalkaloiden ..	15
3 Problemstellung und Zielsetzung	19
4 Material und Methoden	21
4.1 Chemikalien und Materialien	21
4.2 Methoden.....	26
4.3 Einkristallstrukturanalytik	45
5 Ergebnisse und Diskussion	47
5.1 Untersuchungen zum Epimerisierungsverhalten von Ergotalkaloiden	47
5.2 Analysenverfahren zur epimerenspezifischen Quantifizierung von Ergotalkaloiden ..	54
5.3 Epimerisierungs- und Abbauverhalten durch Backen und im <i>in vitro</i> Verdaumodell .	79
5.4 Untersuchung von Ergotalkaloid-Konjugaten.....	90
5.5 Strukturelle Charakterisierung.....	104

6 Zusammenfassung	106
Literaturverzeichnis.....	112

Abkürzungsverzeichnis

Au	Arbitrary Units (willkürliche Einheiten)
BAGKF	Bundesanstalt für Getreide-, Kartoffel- und Fettforschung
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BG	Bestimmungsgrenze bzw. Bestimmungsgrenzen
Cps	Counts per second (Zählerstand pro Sekunde)
DAD	Diode Array Detector (Diodenarray Detektor)
EC	European Commission (Europäische Kommission)
EFSA	European Food Safety Authority (Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit)
ESI	Elektronenspray Ionisation
FLD	Fluoreszenzdetektor
FuttMV	Futtermittelverordnung
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigchromatographie)
LEM	Lumi-Ergometrin
LFGB	Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch
MRI	Max Rubner-Institut
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS/MS	Tandem Massenspektrometrie
NG	Nachweisgrenze bzw. Nachweisgrenzen
p.a.	Pro analysi (zur Analyse)
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
pK _a	Säuredissoziationskonstante
PSA	Primary secondary amine adsorbents (Primäres und sekundäres Amin-Adsorptionsmittel)
R ²	Quadrat des linearen Regressionskoeffizienten
RP	Reversed phase (Umkehrphase)
Rpm	Rounds per Minute (Umdrehungen pro Minute)
SCX	Strong Cation Exchange Resin (Kationenaustauscherharz)
SPE	Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)
s _y	Reststandardabweichung
TIC	Totalionenchromatogramm
t _R	Retentionszeit
UV	Ultraviolett
λ	Wellenlänge

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lebenszyklus des Pilzes <i>Claviceps purpurea</i> [2].....	1
Abbildung 2: Grundstrukturen der Clavin-Alkaloide und der Lactam-Ergotalkaloide [8].....	3
Abbildung 3: Grundstrukturen von Ergometrin und den Ergopeptinen [8].	3
Abbildung 4: Strukturen der Neurotransmitter Dopamin 5, Noradrenalin 6 und Serotonin 7 im Vergleich zu der Ergolin-Grundstruktur der Ergotalkaloide.	6
Abbildung 5: Schema der Epimerisierung der Ergotalkaloide am C8-Atom am Beispiel des α -Ergocryptin(in)s [10].....	7
Abbildung 6: Reaktionsschema der Addition von Wasser an die C9-C10-Doppelbindung von Ergometrin 1 zu 10-(<i>S</i>)-LEM 13 und 10-(<i>R</i>)-LEM 12 über die Bildung eines Carbeniumions 11 [10].	9
Abbildung 7: Schema der C2'-Epimerisierung zur Bildung von Aci-Ergotalkaloiden am Beispiel des α -Ergocryptin(in) [40].....	11
Abbildung 8: Spektrum der UV-Lampe (Universal UV-Lampe TL-900).....	42
Abbildung 9: Prozentualer Anteil von Ergocorninin am Gesamt-Ergocornin(in)-Gehalt bzw. α -Ergocryptinin am Gesamt- α -Ergocryptin(in)-Gehalt in verschiedenen Lösungsmittelgemischen (Tabelle 12) über 96 Stunden.	48
Abbildung 10: Mögliche Koordination des Hexansulfonates an der N6-Position von Ergotalkaloiden	49
Abbildung 11: Zeitliche Veränderung des prozentualen Gehalts des eingesetzten Epimers im Verhältnis zum Gesamtergotalkaloidgehalt in Acetonitril:Wasser + 10 mM Ammoniumcarbammat (1:4, v:v) [78].	50
Abbildung 12: Strukturformeln von Ergocornin und α -Ergocryptin	52

Abbildung 13: Darstellung des Phasenraumes für das (<i>R</i>)-Epimer R, das (<i>S</i>)-Epimer S und den Übergangszustand T	53
Abbildung 14: Extraktionsvergleich zwischen den Lösungsmitteln Acetonitril:Wasser (84:16, v:v) mit und ohne den Zusatz des basischen Modifiers Ammoniumcarbonat.	56
Abbildung 15: Schema zur Bindung von Ergotalkaloiden 26 an ein Na ⁺ -SCX-Harz 27 und anschließende Spaltung mittels Natriumhexansulfonat.	60
Abbildung 16: Lineare Alkylsulfonate: Natriumbutan- 31, Natriumpentan- 32 und Natriumhexansulfonat 33.	61
Abbildung 17: FLD-Chromatogramme einer ergotalkaloidfreien Roggenmatrix ohne Entfernung der Matrixkomponenten und nach Elution der Matrixkomponenten mit 2, 5 und 10 mL Acetonitril:Wasser.	64
Abbildung 18: Schematische Darstellung des Analysenverfahrens zum Nachweis von Ergotalkaloiden in Roggenmehl.	65
Abbildung 19: Ergotalkaloidgehalte in Roggenmehl quantifiziert mit (a) Analysenverfahren mit Probenvorbereitung unter Verwendung eine SCX-Harzes (n = 6) und (b) mit dem Verfahren nach §64 LFGB (n = 5).	66
Abbildung 20: Schematische Darstellung des Analysenverfahrens zum Nachweis von Ergotalkaloiden in Speiseöl.	69
Abbildung 21: FLD-Chromatogramme von (a) Mischung von 12 Ergotalkaloid-Standards mit 30 µg kg ⁻¹ pro Verbindung, (b) mit Sklerotien dotiertes Roggenmehl (1745,6 ± 4,5 µg kg ⁻¹) und (c) natürlich kontaminiertes Weizenkeimöl (19,5 ± 1,1 µg kg ⁻¹).	77
Abbildung 22: Ergotalkaloidgehalte in Mehl (M) und in Keksen nach einer Backzeit von 9 min, 13 min sowie 17 min.	80
Abbildung 23: Ergotalkaloidgehalte (a) in Mehl und (b) in Brot.	81

Abbildung 24: Ergotalkaloidgehalte der Kekse nach Verdau unter Variation der Verdauzeiten in der Darmlösung von 2 und 6 Stunden.....	82
Abbildung 25: Schema des verwendeten <i>in vitro</i> Verdaumodells.....	82
Abbildung 26: FLD-Chromatogramme von (a) Mischung von 12 Ergotalkaloid-Standards mit 20 µg kg ⁻¹ pro Verbindung, (b) mit Sklerotien dotiertes Roggenmehl (Gesamtergotalkaloidgehalt 42 mg kg ⁻¹), (c) Keks aus mit Sklerotien dotiertem Roggenmehl (36 mg kg ⁻¹) und (d) Keks nach <i>in vitro</i> Verdau (33 mg kg ⁻¹).....	83
Abbildung 27: Ergotalkaloidgehalte (M) im Mehl, (a) in Keksen nach 9 min Backzeit und (b) nach Verdau, (c) nach 13 min Backzeit und (d) nach Verdau, (e) nach 17 min Backzeit und (f) nach Verdau.....	85
Abbildung 28: Ergotalkaloidgehalte in (a) Brot und (b) nach Verdau.....	86
Abbildung 29: Ergotalkaloidgehalt der (a) Standardlösung und (b) nach Verdau.....	87
Abbildung 30: Ergotalkaloidgehalt in Keksen mit einer Backzeit von 13 min, nach <i>in vitro</i> Verdau in (a) Speichel, (b) Speichel und Magensaft, (c) Speichel, Magensaft und Darmsaft.....	88
Abbildung 31: Ergotalkaloidgehalt in (13) Keksen, nach Darmverdau mit (a) allen Enzymen, (b) nur mit Galle, (c) nur mit Trypsin und (d) nur mit Pankreatin.....	90
Abbildung 32: Kristallstruktur von 10-(S)-LEM [110].....	92
Abbildung 33: Kristallstrukturen von (a) Ergometrin-Maleat [71] und (b) Ergometrinin [97].	92
Abbildung 34: HPLC-DAD-Chromatogramme ($\lambda = 224$ nm) von (a) Ergometrin-Maleat und (b) Ergometrin-Maleat nach 8,5 Stunden Bestrahlung bei $\lambda = 350$ nm in essigsaurer Lösung.	94
Abbildung 35: MRM-Chromatogramme (m/z 344,05→223,2) von (a) Ergometrin-Maleat nach 8,5 Stunden Bestrahlung bei $\lambda = 350$ nm in wässriger essigsaurer Lösung und (b) einem Sklerotienextrakt (Probe Nr. 1, Tabelle 30).....	94

Abbildung 36: Strukturen von Ricinol- 29 und Linolsäure 30.....	97
Abbildung 37: Totalionenchromatogramm (TIC) der synthetisierten Ergotalkaloid-Fettsäure-Konjugate (die Messung erfolgte in zwei Zeitfenstern).....	101
Abbildung 38: Darstellung der zwei intensivsten MRM Übergänge des Ergotamin-Linolsäure-Konjugats von (a) synthetisiertem Standard und (b) in Sklerotienextrakt.	102
Abbildung 39: Peakflächen der Ergotalkaloid-Linolsäure- bzw. Ergotalkaloid-Ricinolsäure-Konjugate in Sklerotienmehlextrakten nach 0 - 5 Stunden UV-Bestrahlung von Sklerotienmehl (n = 3).....	103
Abbildung 40: Kristallstrukturen von c Ergometrinin [97], d Ergometrin-Maleat [71], e Ergotaminin [99] und f Ergotamin-Tartrat-(bis)-Ethanol-Solvat [67].....	104

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Strukturelle Einteilung der prioritären Ergotalkaloide.	4
Tabelle 2: Zusammenfassung von Analysenverfahren zur epimerenspezifischen Quantifizierung von Ergotalkaloiden.	18
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien.	21
Tabelle 4: Verwendete Geräte und Verbrauchsgegenstände.	23
Tabelle 5: Verwendete Software.	25
Tabelle 6: Zusammenfassung der verwendeten Chromatographischen Methoden.	26
Tabelle 7: Beispielhafte Darstellung von Kalibriergeraden für die Back- und Verdauxperimente.	35
Tabelle 8: Bedingungen des Brotbackprozesses.	36
Tabelle 9: Zusammensetzung der verwendeten Verdaulösungen.	37
Tabelle 10: Übersicht des Abbaus und der Veränderung vom Anteil des (<i>R</i>)-Epimers am jeweiligen Gesamtergotalkaloidgehalt der durchgeführten Back- und Verdauxperimente. ...	40
Tabelle 11: Darstellung der eingesetzten Substanzmengen zur Synthese der Ergotalkaloid-Fettsäure-Konjugate.	44
Tabelle 12: Auswahl an Lösungsmittelgemischen, welche in der Literatur für die epimerenspezifische Ergotalkaloidanalytik verwendet werden.	47
Tabelle 13: Darstellung der Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten.	51
Tabelle 14: Mittlere Dihedralwinkel am C8-Atom und deren Varianz in Wasser und Acetonitril.	53

Tabelle 15: Prozentualer Anteil der Ergotalkaloidgehalte in den Lösungen nach Extraktion mit Hilfe des makroporösen Na ⁺ -Kationenaustauscherharzes unter Variation der Parameter Ergotalkaloidgehalt, Partikelgröße und Extraktionszeit (n = 3).....	58
Tabelle 16: Bestimmung der Wiederfindungsrate nach Variation der Elutionszeit unter Verwendung von 2 mL Natriumhexansulfonat (352 mM) in Acetonitril:Wasser (84:16, v:v), (n = 1).....	61
Tabelle 17: Bestimmung der Wiederfindungsraten unter Verwendung der Tenside Na ⁺ -Butan-, Na ⁺ -Pentan- und Na ⁺ -Hexansulfonat in der Elutionslösung (n = 3, V = 4 mL, Elutionszeit 15 min).	62
Tabelle 18: Bestimmung der Wiederfindungsrate unter Verwendung von 5 und 10 mL Waschlösung (n = 3).....	63
Tabelle 19: Darstellung des Anteils des (<i>R</i>)-Epimers am jeweiligen Gesamtergotalkaloidgehalt nach Bestimmung mit SCX-Harz Verfahren (n = 6) und dem Verfahren nach §64 LFGB (n = 3).....	67
Tabelle 20: Wiederfindungsraten bei Elution der Matrixbestandteile mit Aceton (n = 3).	69
Tabelle 21: Darstellung der Validierungskenndaten für die Linearität.....	70
Tabelle 22: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Matrix Roggenmehl.	71
Tabelle 23: Wiederfindungsraten für dotiertes Roggenmehl mit Ergotalkaloidgehalten von 2, 30 und 50 µg kg ⁻¹ (n = 6).	72
Tabelle 24: Messpräzision für ein mit Sklerotienmehl dotiertes Roggenmehl (n = 6).....	73
Tabelle 25: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für Rapsöl (n = 6).....	74
Tabelle 26: Wiederfindungsraten für dotiertes Rapsöl mit Gehalten von 2, 30 und 50 µg kg ⁻¹ (n = 6).....	75
Tabelle 27: Messpräzision für ein dotiertes Rapsöl, Dotierlevel 30 µg kg ⁻¹ pro Analyt.	76

Tabelle 28: Ergotalkaloidgehalte der analysierten Roggenmehle und Weizenkeimöle (n = 3).	78
Tabelle 29: Optimierte MS/MS-Parameter der drei intensivsten Produkt-Ionen $[M+H]^+$ von 10-(S)-LEM $[M+H]^+$ ($m/z = 344,05$).	93
Tabelle 30: Peakflächen von 10-(S)-LEM (m/z 344,05→223,2) und Ergometrin (m/z 326,2→223,2) verschiedener Sklerotienextrakte.	95
Tabelle 31: Molekülonen $[M+H]^+$, die fünf intensivsten Produkt-Ionen $[M+H]^+$ und Zuordnung der Produkt-Ionen [111] der synthetisierten Ergotalkaloid-Fettsäureverbindungen.	98
Tabelle 32: Vergleich der m/z der $[M+H]^+$ der berechneten und der gemessenen Massen der Ergotalkaloid-Fettsäure-Konjugate.	99
Tabelle 33: Massenübergänge der drei intensivsten Fragmentionen der synthetisierten Ergotalkaloid-Fettsäure-Konjugate (m/z) mit den optimierten MS/MS-Parametern nach Spritzenpumpenoptimierung.	100

1 Einleitung

1.1 Vorkommen und Lebenszyklus des Pilzes *Claviceps purpurea*

Der parasitäre Schlauchpilz *Claviceps purpurea* bildet auf Süßgräsern (*Poaceae*), insbesondere auf Roggen, Mutterkörner (Sklerotien) aus. Die Sklerotien sind dunkel gefärbt und härter sowie in der Regel deutlich größer als normale Getreidekörner. In den Sklerotien sind verschiedene sekundäre Stoffwechselprodukte des Pilzes *C. purpurea* enthalten, unter anderem Substanzen der Gruppe der Ergotalkaloide. Von den Ergotalkaloiden sind mittlerweile mehr als 50 verschiedene Verbindungen bekannt [1], wobei von dem Pilz *C. purpurea* hauptsächlich sechs verschiedene Ergotalkaloide (prioritäre Ergotalkaloide) gebildet werden. Das Sklerotium ist ein Dauermyzel und stellt die Überwinterungsform des Pilzes *C. purpurea* dar. Es fällt bei der Ernte zu Boden, treibt im darauffolgenden Frühjahr Sporen aus und infiziert die unbefruchteten Blüten des Getreides. Dort wächst der Pilz und bildet Honigtau, welcher asexuelle Sporen enthält. Durch die Verteilung des Honigtaus auf andere Getreidepflanzen ist eine weitere Infektion und Ausbreitung des Pilzes möglich [2]. Der Lebenszyklus des Pilzes ist in Abbildung 1 graphisch dargestellt.

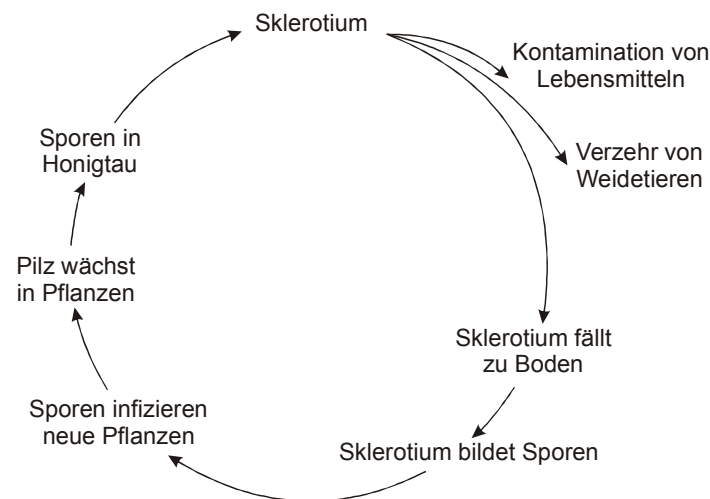


Abbildung 1: Lebenszyklus des Pilzes *Claviceps purpurea* [2].

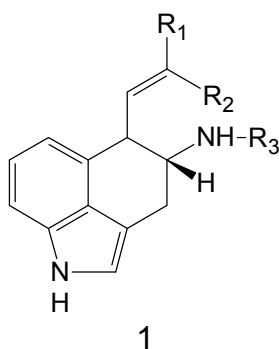
Die Stärke des Mutterkornbefalls von Getreide und der Ergotalkaloidgehalt in den Sklerotien sind von verschiedenen klimatischen Faktoren abhängig [3]. So bewirkt ein kalter Winter, dass auf dem Boden liegende Mutterkörner im Frühjahr stark austreiben. Ein regnerischer

Frühsommer verringert den Pollenflug des Getreides und führt damit zu einer verlängerten Getreideblütezeit – die Sporen des Pilzes *C. purpurea* können über einen längeren Zeitraum mehr Getreidepflanzen infizieren. Ein sich anschließender kalter Sommer mit mittleren Temperaturen von 17,5 bis 19,0 °C führt zu einer maximalen Alkaloidsynthese in den Sklerotien [3]. Von den Getreidesorten Roggen, Gerste, Weizen und Hafer ist Roggen besonders stark durch eine Infektion mit dem Pilz *C. purpurea* betroffen. Das erklärt sich dadurch, dass Roggen zu den Fremdbefruchtern zählt und die Blüte dadurch lange geöffnet bleibt [3]. Im Gegensatz dazu sind die Blüten der Selbstbefruchter nur kurz geöffnet, was das Risiko einer Infektion verringert [3].

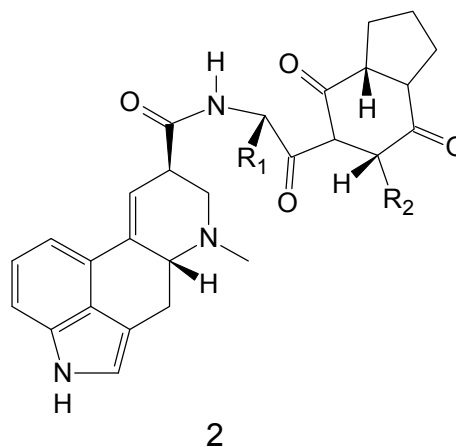
Neben *C. purpurea* existieren verwandte Schlauchpilze, welche auch Ergotalkaloide bilden. So ist beispielsweise in Sklerotien des Pilzes *Claviceps africana*, der auf Sorghumhirsen wächst, hauptsächlich Dihydroergosin und damit ein ganz anderes Spektrum an Ergotalkaloiden zu finden [4,5]. Ein weiteres Beispiel für die Unterschiede im gebildeten Ergotalkaloidspektrum der verschiedenen Arten innerhalb der Gattung der *Claviceps* Schlauchpilze stellt der *Claviceps zizaniae* dar, welcher nur die Ergopeptine α -Ergocryptin und α -Ergocryptinin produziert [6]. Ergotalkaloide sind nicht nur bei Pflanzen der Familie der Süßgräser (*Poaceae*) zu finden, sondern konnten auch aus den Samen von einigen Spezies der Gattung *Ipomoea* (Prunkwinden) isoliert werden [7]. Hier wurden Elymoclavin und Lysergol nachgewiesen.

1.2 Struktur von Ergotalkaloiden

Strukturell gehören die Ergotalkaloide zur Gruppe der Indolalkaloide. Sie besitzen alle ein Ergolin-Grundgerüst (Abbildung 3). Dieses Grundgerüst ist an dem Stickstoffatom N6 methyliert und hat eine Doppelbindung an der C9-C10-Position. Am Kohlenstoffatom C8 im D-Ring des Ergolin-Grundgerüsts befindet sich ein Amid-Rest, in welchem sich die Ergotalkaloide voneinander unterscheiden [8]. Je nachdem, welche Substituenten sich an der C8-Position befinden, werden die Ergotalkaloide in vier verschiedene Gruppen eingeteilt: (1) Clavin Alkaloide und 6,7-Secoergolene (Alkaloide mit offenem D-Ring) (Abbildung 2), (2) Lactam-Ergotalkaloide (Abbildung 2), (3) einfache Lysergsäurederivate (Abbildung 3) und (4) Ergopeptine (Abbildung 3).



Grundstruktur der Clavin-Alkaloide



Grundstruktur der Lactam-Ergotalkaloide

Abbildung 2: Grundstrukturen der Clavin-Alkaloide und der Lactam-Ergotalkaloide [8].

Durch *C. purpurea* werden vorrangig das einfache Lysergsäureamid Ergometrin und fünf verschiedene Ergopeptine gebildet (Abbildung 3).

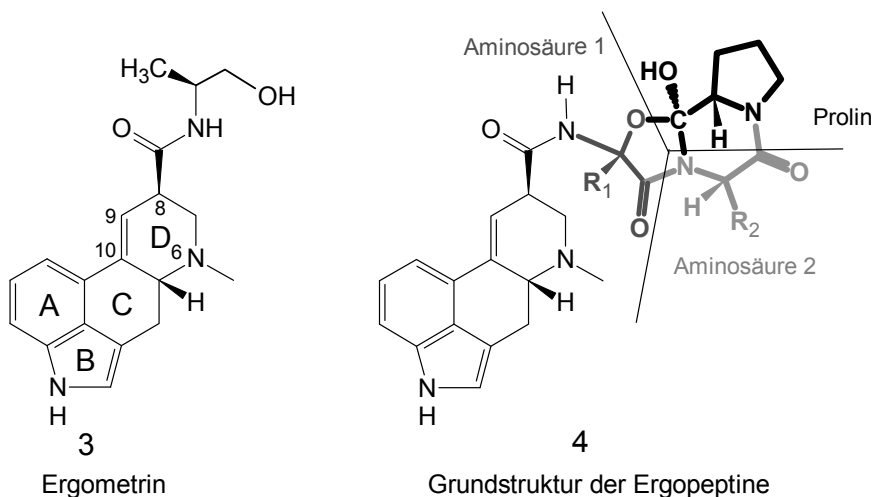


Abbildung 3: Grundstrukturen von Ergometrin und den Ergopeptinen [8].

Ergometrin trägt am Stickstoffatom des Amidrestes einen Hydroxypropylsubstituenten und stellt damit das polarste der sechs prioritären Ergotalkaloide dar. Im Gegensatz dazu tragen die Ergopeptine am Amidstickstoffatom einen trizyklischen Ring als Substituenten, dessen Struktur erstmals 1951 anhand des Ergotamins aufgeklärt werden konnte [9]. Dieser Substituent ist aus Prolin und zwei weiteren Aminosäuren aufgebaut (Abbildung 3). Ergopeptine unterscheiden sich somit durch die unterschiedlichen Substituenten R_1 und R_2 (Abbildung 3)

voneinander. Die Gruppe der Ergopeptine lässt sich in Ergotamin-, Ergotoxin-, Ergoxin- und Ergotannin-Alkaloide unterteilen [8]. In Tabelle 1 ist die Einteilung der Ergopeptine der in dieser Arbeit betrachteten prioritären Ergotalkaloide (und β -Ergocryptin), welche hauptsächlich in den Sklerotien enthalten sind, dargestellt. Bei den Ergopeptinen die zur Gruppe der Ergoxin- bzw. Ergotannin-Ergotalkaloide zählen, befindet sich an der Position R₁ (Struktur 4, Abbildung 3) eine Ethyl- bzw. sec-Butylgruppe.

Tabelle 1: Strukturelle Einteilung der prioritären Ergotalkaloide.

Ergotalkaloid	R ₁	R ₂	Aminosäure 1*	Aminosäure 2*
Ergotamin-Ergotalkaloide				
Ergosin	Methyl	iso-Butyl	Ala	Leu
Ergotamin	Methyl	Benzyl	Ala	Phe
Ergotoxin-Ergotalkaloide				
Ergocornin	iso-Propyl	iso-Propyl	Val	Val
α -Ergocryptin	iso-Propyl	iso-Butyl	Val	Leu
β -Ergocryptin	iso-Propyl	sec-Butyl	Val	Ile
Ergocristin	iso-Propyl	Benzyl	Val	Phe

* Ala: Alanin, Val: Valin, Leu: Leucin, Phe: Phenylalanin, Ile: Isoleucin

Jedes der prioritären Ergotalkaloide kommt in zwei epimeren Formen vor, da das Stereozentrum an der C8-Position (*R*)- oder (*S*)-konfiguriert sein kann (Abbildung 5). Die (*R*)-konfigurierten Ergotalkaloide tragen im Namen das Suffix „-in“, die (*S*)-konfigurierten das Suffix „-inin“. Die Umwandlung beider Formen ineinander verläuft beschleunigt unter sauren oder basischen Bedingungen [10]. Dieser Umwandlung kommt eine besondere Bedeutung zu, da die (*S*)-konfigurierten Ergotalkaloide biologisch inaktiv sind (Abschnitt 1.3), wogegen die (*R*)-konfigurierten Verbindungen eine toxikologische Relevanz besitzen [11].

1.3 Historischer Hintergrund zum Mutterkorn und Wirkungsweise von Ergotalkaloiden

Durch den Verzehr von mit Mutterkorn verunreinigtem Roggenbrot kam es im Mittelalter zum epidemieartigen Auftreten einer Krankheit [12], die viele Todesopfer zur Folge hatte. Das erste dokumentierte Auftreten der Erkrankung Ergotismus stammt aus den Jahren 944-945, wobei um die 20000 Menschen in der Aquitaine Region in Frankreich durch eine Mutterkorn-

vergiftung starben [13]. Das Antoniusfeuer oder *ignis sacer* (heiliges Feuer) [3] sind Synonyme für diese Erkrankung, eine Vergiftung, welche in zwei verschiedenen Ausprägungen auftritt. Der Ergotismus gangraenosus (Brandseuche) äußert sich in starken Schmerzen in den Gliedmaßen, was im weiteren Krankheitsverlauf oft zum Absterben der Gliedmaßen durch verringerte Durchblutung führt. Bei der zweiten Ausprägung der Krankheit, dem Ergotismus convulsivus (Krampfseuche, Kribbelkrankheit), kommt es zu Taubheitsgefühlen und Kribbeln in Händen und Füßen. Je nach Stärke der Ausprägung und Stadium der Krankheit kann es zu Spasmen in den Extremitäten kommen, welche sich über den ganzen Körper ausbreiten können [14]. Da der Zusammenhang zwischen den Sklerotien und dem Auftreten des Ergotismus im Mittelalter noch nicht bekannt war, konnte die Krankheit zu dieser Zeit auch nicht eingedämmt werden, was die hohe Zahl der Todesopfer [13] erklärt. Im Jahre 1630 wurde durch den Arzt Tuillier mit Hilfe systematischer Fütterungsversuche von Mutterkorn an Tiere der Zusammenhang zwischen dem Verzehr von mutterkornhaltigem Getreide und dem Auftreten dem Ergotismus nachgewiesen [3].

Mutterkorn wurde aufgrund seiner blutstillenden Eigenschaften und der uteruskontrahierenden Wirkungsweise in Form von gemahlenem Pulver als Medikament zur Einleitung von Geburtswehen und für Abtreibungen verwendet [15]. Es wurde bereits 1582 in das Kräuterbuch von Lonitzer aufgenommen und dort als Heilmittel in der Geburtshilfe genannt [16]. Durch den stark schwankenden Ergotalkaloidgehalt in Sklerotien kam es oft zu Fehldosierungen mit fatalen Folgen für Mutter und Kind [3]. Zur Abschätzung der Toxizität von Mutterkorn gilt laut Literatur Getreide und Mehl, welches mit 1 % Mutterkorn kontaminiert ist, als toxisch. Ist es mit 7 % bzw. 8 % Mutterkorn kontaminiert gilt es als lebensgefährlich [17]. Gegenwärtig werden Gesamtextrakte aus Mutterkorn wegen des unterschiedlichen Wirkspektrums der enthaltenen Alkaloide nicht mehr therapeutisch eingesetzt [18,19]. In seiner Reinform kommen Ergotamin als Ergotamin-Tartrat und Ergometrin als Ergometrin-Hydrogenmaleat in Medikamenten zum Einsatz. Als Dosierungsempfehlung für die orale Aufnahme von Ergotamin-Tartrat in Anti-Migränemitteln nennt der Kommentar des Europäischen Arzneibuchs 1 - 2 mg und maximal 6 mg pro Migräneanfall und Tag sowie maximal 10 mg pro Woche [20]. Durch die starken Nebenwirkungen wie Hypertonie, Gefäßerkrankungen oder Koronarinsuffizienz [18] darf beispielsweise für das Medikament ergo sanol® Spezial N Kapseln (1 mg Ergotamin-Tartrat pro Kapsel) laut der Roten Liste (2003) [21] die Gesamtdosis pro Monat von 20 Kapseln nicht überschritten werden. Ergometrin wird in der Geburtshilfe verwendet, da

Ergotalkaloide in kleinen Dosen rhythmische Kontraktionen an der Uterusmuskulatur bewirken. Hier wird nur Ergometrin verwendet, da es im Gegensatz zu Ergotamin praktisch keine vasokonstriktorisches und α -Adrenorezeptor blockierenden Effekte aufweist [22] und einen besonders starken Effekt auf die Uteruskontraktion während der Schwangerschaft zeigt [23].

Die Wirkungsweise der Ergotalkaloide beruht auf ihrer strukturellen Verwandtschaft zu den Neurotransmittern Dopamin, Noradrenalin und Serotonin (Abbildung 4) [13].

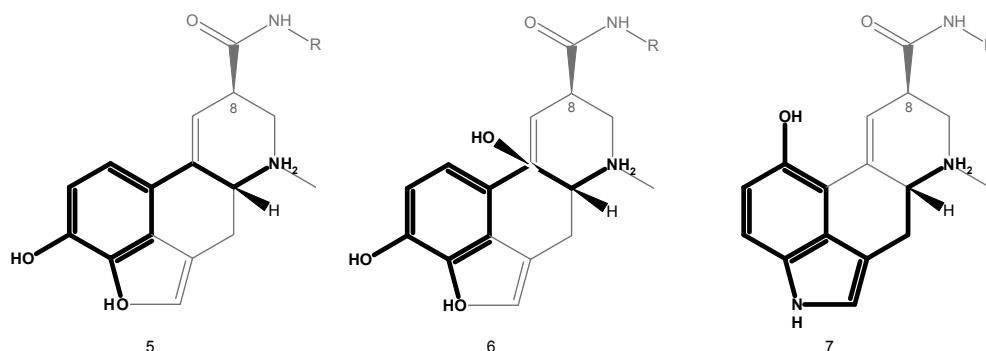


Abbildung 4: Strukturen der Neurotransmitter Dopamin **5**, Noradrenalin **6** und Serotonin **7** im Vergleich zu der Ergolin-Grundstruktur der Ergotalkaloide.

Dadurch können Ergotalkaloide mit den Rezeptoren für diese Neurotransmitter wechselwirken [24]. Für diese Wechselwirkungen müssen die Ergotalkaloide an der C8-Position (*R*)-konfiguriert sein. Am Beispiel des Ergotalkaloids Ergotamin konnten Pierri *et al.* [11] durch Konformationsanalyse mit Hilfe von ^1H -NMR Experimenten und Berechnungen der potentiellen Energien zeigen, dass nur eine von 24 verschiedenen Konformationen des Ergotamins die biologisch aktive Spezies darstellt.

Da die pharmakologische Wirkung der Ergotalkaloide jedoch sehr komplex und variabel ist, ist sie letztendlich eine Summe aus Effekten von partiellem Agonismus oder Antagonismus auf adrenerge, dopaminerge und serotonerge Rezeptoren [13]. Neben den beschriebenen Effekten der Ergotalkaloide auf Rezeptoren sind auch andere toxische Effekte beschrieben. So zeigen die Ergopeptine zytotoxische Effekte und eine Akkumulation in menschlichen Primärzellen [25]. In einer weiteren Untersuchung zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke von Ergotalkaloiden konnte in einem *in vitro* Modell gezeigt werden, dass die biologisch inaktiven (*S*)-Epimere die Blut-Hirn-Schranke zwar nicht überwinden können, aber einen großen Einfluss auf die Integrität der Barriere haben [26].

2 Grundlagen

2.1 Epimerisierung am C8-Kohlenstoffatom

Bei der Epimerisierung am C8-Atom werden (*R*)- und (*S*)-Epimere reversibel ineinander umgewandelt. Dabei verläuft die Epimerisierung über eine Zwischenstufe **9**, in der der C8-Kohlenstoff sp^2 -hybridisiert ist (Abbildung 5).

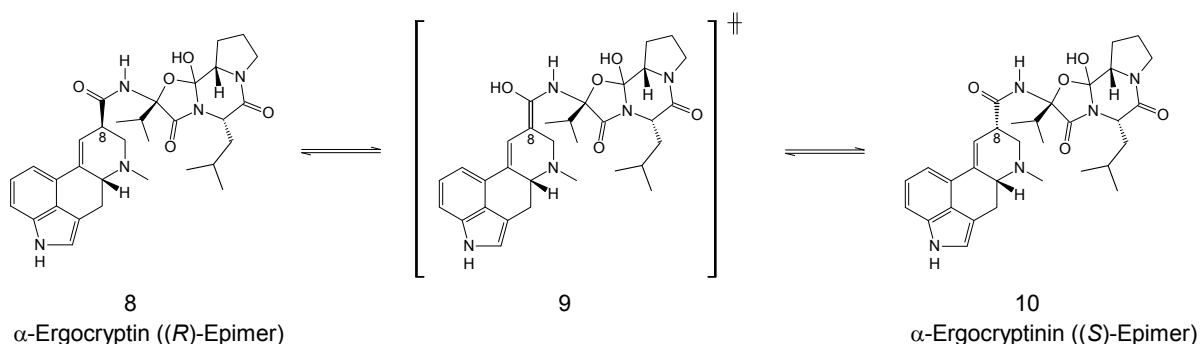


Abbildung 5: Schema der Epimerisierung der Ergotalkaloide am C8-Atom am Beispiel des α -Ergocryptin(in)s [10].

Bei der Zwischenstufe **9** wird die Enolisierung der Carboxylgruppe durch die C9-C10-Doppelbindung stabilisiert, welche in Konjugation mit dem aromatischen System des A- und B-Rings des Ergolin-Grundgerüsts steht [27]. In Gegenwart von Säuren oder Basen wird diese Reaktion beschleunigt [10]. Neben dem pH-Wert der Lösung hat auch das Lösungsmittel einen Einfluss auf die Epimerisierungsrate. So wurde eine sehr langsame Epimerisierung für α -Ergocryptin in aprotischen Lösungsmitteln wie Chloroform, Acetonitril und Aceton beobachtet, wogegen in protischen Lösungsmitteln, wie Methanol bzw. Lösungsmittelgemischen wie Methanol:Wasser (30:70, v:v), die Epimerisierung deutlich beschleunigt verläuft [28]. Eine schnelle Epimerisierung in protischen Lösungsmittelgemischen wurde auch von Hafner *et al.* [29] beobachtet. Die Epimerisierungsrate war in dem Lösungsmittelgemisch Methanol:Dichlormethan (50:50, v:v) am höchsten, gefolgt von: Acetonitril:Wasser + 200 mg L⁻¹ Ammoniumcarbonat (80:20, v:v) > 25%ige Ammoniumhydroxidlösung : Methanol : Ethylacetat : Dichlormethan (1:5:25:50, v:v:v:v) > Stabilisierungslösung (Ethylenglycol, 1,2-Propandiol, Weinsäure, Ethanol, Wasser; 100 g, 100 g, 1 g, 750 mL; 250 mL) > Acetonitril >>

Chloroform. Neben der Abhängigkeit der Epimerisierungsrate von dem verwendeten Lösungsmittel ist die Geschwindigkeit der Epimerisierung auch für jedes Ergotalkaloid verschieden. So ist das einfache Lysergsäureamid Ergometrin bezüglich der Epimerisierung von den in dieser Arbeit betrachteten sechs prioritären Ergotalkaloiden am stabilsten, so dass Hafner *et al.* [29] für dieses Ergotalkaloid keine Epimerisierung in allen verwendeten Lösungsmittelgemischen beobachteten.

2.2 Derivate von Ergotalkaloiden

Stoll und Schlientz konnten 1955 [30] erstmals Verbindungen isolieren, die beim Belichten (mit direkten Sonnenlicht) der Ergotalkaloide Ergotamin und Ergotaminin in wässrigen sauren Lösungen entstehen. Sie konnten zeigen, dass an die C9-C10-Doppelbindung am Ergolin-Grundgerüst Wasser addiert wird. Die bei dieser Reaktion entstehenden Verbindungen werden als Lumi-Ergotalkaloide bezeichnet, da die Reaktion nur unter Einfluss von Licht stattfindet [30]. Diese Ergotalkaloid-Abbauverbindungen haben wie die Ergotalkaloide eine toxikologische Relevanz. So zeigt Lumi-Ergometrin (LEM) qualitativ den gleichen Effekt auf isolierten Rattenuterus, hat aber eine geringere Wirkung als Ergometrin (0,8 %) [31]. Lumi-Ergotalkaloide haben deutlich veränderte Eigenschaften im Vergleich zu den ursprünglichen Ergotalkaloiden. Stoll und Schlientz berichteten dass die auffälligste Änderung „das Fehlen der blauen Fluoreszenz im Ultraviolettlicht“ ist [30]. Des Weiteren kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums hin zu kürzeren Wellenlängen (Ergometrin $\lambda_{\max} = 318 \text{ nm}$, 10-(S)-LEM $\lambda_{\max} = 293 \text{ nm}$ [30]). Außerdem sind Lumi-Ergotalkaloide polarer und stärkere Basen als ihre korrespondierenden Ergotalkaloide, weil die angelagerte OH-Gruppe die Basizität des N6-Atoms im Ergolin-Grundgerüst erhöht [30,32]. Die Reaktion zur Bildung von Lumi-Ergotalkaloiden verläuft regioselektiv, so dass die Anlagerung der OH-Gruppe immer an der C10-Position erfolgt. Diese Selektivität kann durch den Mechanismus der Reaktion erklärt werden, bei dem ein Carbeniumion entsteht, welches am tertiären C10 stabilisiert wird (Abbildung 6) [10].

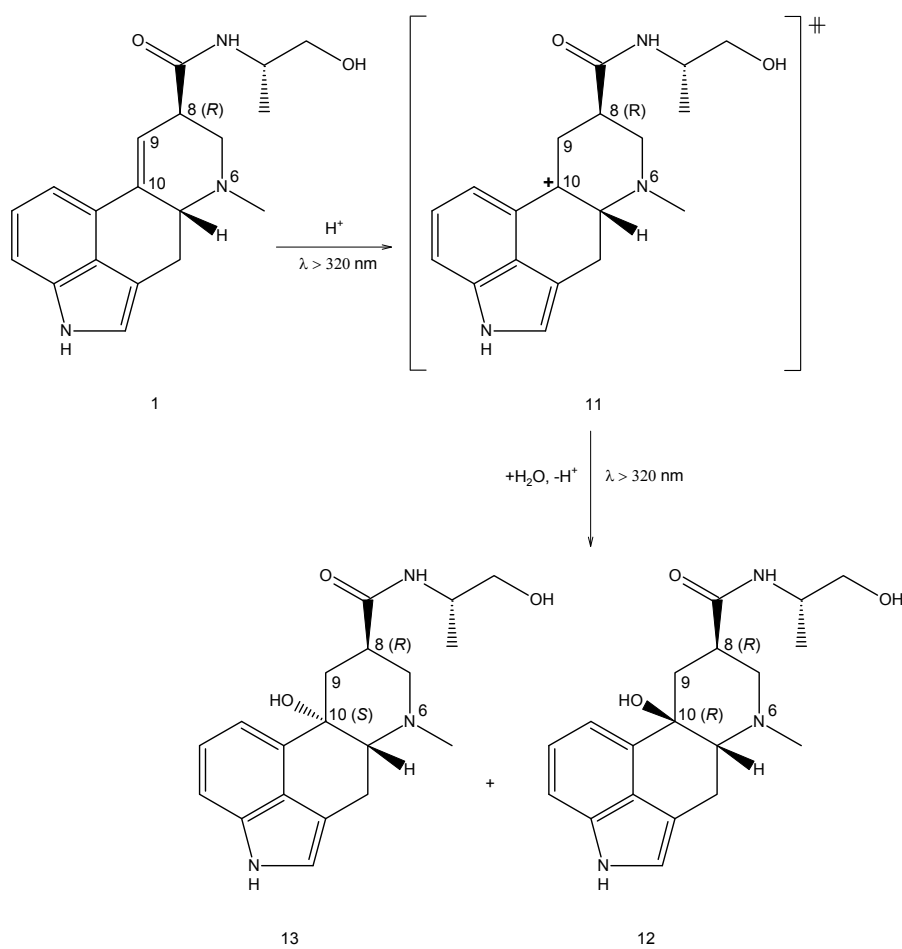


Abbildung 6: Reaktionsschema der Addition von Wasser an die C9-C10-Doppelbindung von Ergometrin **1** zu 10-(*S*)-LEM **13** und 10-(*R*)-LEM **12** über die Bildung eines Carbeniumions **11** [10].

Durch die Addition von Wasser entsteht an der C10-Position des Ergolin-Grundgerüsts ein asymmetrisches Kohlenstoffatom, welches zur Bildung von zwei verschiedenen Lumi-Ergotalkaloiden führt, wobei eines der Stereoisomere in deutlich geringeren Mengen entsteht. Bei dem Lysergsäureamid Ergometrin konnte durch Stoll und Schlientz, 1955 [30] und Hellberg, 1957 [32] nur eines der Stereoisomere isoliert werden. 1959 gelang es Hellberg [33] beide Isomere mit einer Ausbeute von 65 % und 1 % zu isolieren. Die Unterscheidung und Zuordnung der beiden Lumi-Ergotalkaloid-Isomere erfolgte über den Vergleich mit den korrespondierenden Dihydro-Ergotalkaloiden bezüglich der Ausbeuten, der Elutionsreihenfolge auf Aluminiumoxid und des optischen Drehwinkels in Pyridin [30]. Dabei führte jedoch der Vergleich des Drehwertes für LEM nicht zu konsistenten Ergebnissen [32]. Aus diesem Grund war keine eindeutige Zuordnung möglich, welches der Stereoisomere an der C10-Position (*R*)- oder (*S*)-konfiguriert ist. Im Gegensatz zu dem C8-(*R*) konfigurierten Ergometrin erfolgt

bei dem C8-(*S*) konfigurierten Ergometrinin die Bildung beider Lumi-Stereoisomere in vergleichbarer Größenordnung (20 und 37 % für 10-(*S*)- und 10-(*R*)-Lumi-Ergometrinin) nach der Bestrahlung unter UV-Licht in einer sauren wässrigen Lösung [32]. Für diesen Unterschied der Ausbeuten zwischen den LEM und Lumi-Ergometrinin Verbindungen gibt es bislang keine Erklärung.

Der erste Nachweis von Lumi-Ergotalkaloiden erfolgte in Ergotalkaloid-Rohextrakten mit Hilfe der Papierchromatographie, gefolgt von Photometrischer Detektion des *p*-Dimethylaminobenzaldehyd-Lumi-Ergotalkaloid-Derivats [34]. Da keine Unterscheidung zwischen verschiedenen Lumi-Ergotalkaloiden mit dieser Methode möglich war, konnte nur die Summe aller Lumi-Ergotalkaloide in einer Probe angegeben werden. Durch Bethke *et al.* [35] erfolgte 1976 die Quantifizierung von Lumi-Ergotalkaloiden in pharmazeutischen Proben über die HPLC-UV. In einer anderen Anwendung wurde die Umwandlung von Ergotalkaloiden in ihre Lumi-Verbindungen mittels Nachsäulenderivatisierung zum selektiven Nachweis von Ergotalkaloiden in komplexen Matrices wie Urin ausgenutzt [36]. Ein Nachweis von Lumi-Ergotalkaloiden in Sklerotien ist bislang noch nicht erfolgt.

Neben den Lumi-Ergotalkaloiden gibt es weitere Ergotalkaloid-Derivate wie die Dihydro-Ergotalkaloide. Mantle und Waight [5] konnten 1968 zeigen, dass Dihydro-Ergotalkaloide auch natürlich vorkommen, indem sie Dihydroergosin aus Sorghum-Sklerotien des Pilzes *Sphacelia sorghi* der Gattung *Claviceps* isolierten. Bei den Dihydro-Ergotalkaloiden befindet sich an der C9-C10-Position eine Einfachbindung. Das hat zur Folge, dass das Absorptionsspektrum der Dihydro-Ergotalkaloide mit dem der Lumi-Ergotalkaloide vergleichbar ist [30]. Erstmals wurden Dihydro-Ergotalkaloide 1936 von Jacobs und Craig im Labor durch Hydrierung der C9-C10-Doppelbindung mit Hilfe eines Platinoxidkatalysators [37] und 1943 von Stoll und Hofmann mittels eines Palladiummohr-Katalysators [38] synthetisiert. Dadurch, dass an der C9-C10-Position keine Doppelbindung mehr vorhanden ist, ist die Stabilisierung der Enol-Zwischenstufe **7** nicht mehr möglich und die Epimerisierung am C8-Kohlenstoff wird folglich nicht mehr beobachtet [38]. In ihren toxikologischen Eigenschaften weichen die Dihydro-Ergotalkaloide von denen der Ergotalkaloide in der Art ab, dass die Toxizität herabgesetzt ist, wobei die neuro-vegetative Wirkung erhalten bleibt [38].

Weitere Ergotalkaloid-Derivate entstehen durch Isomerisierung des C2'-Kohlenstoffatoms im trizyklischen Rest der Ergopeptine (Abbildung 7). Diese als Aci-Ergotalkaloide bezeichneten Verbindungen entstehen schon nach wenigen Minuten durch Kochen von Ergotalkaloiden in saurer Lösung [39]. Da die Reaktion reversibel ist und einher geht mit der Epimerisierung am C8-Atom, wurde 1961 von Schlientz *et al.* [39] für das Ergotalkaloid Ergotamin die Einstellung eines Gleichgewichts aus Ergotamin, Aci-Ergotamin, Ergotaminin und Aci-Ergotaminin beobachtet. Im Vergleich zu den ursprünglichen Ergotalkaloiden zeigen die Aci-Ergotalkaloide die gleichen UV-Spektren, wogegen die pharmakologische Wirksamkeit herabgesetzt ist [39]. Ein Reaktionsmechanismus der reversiblen Bildung der Aci-Ergotalkaloide wurde von Ott *et al.* vorgestellt [40] und ist in Abbildung 7 dargestellt.

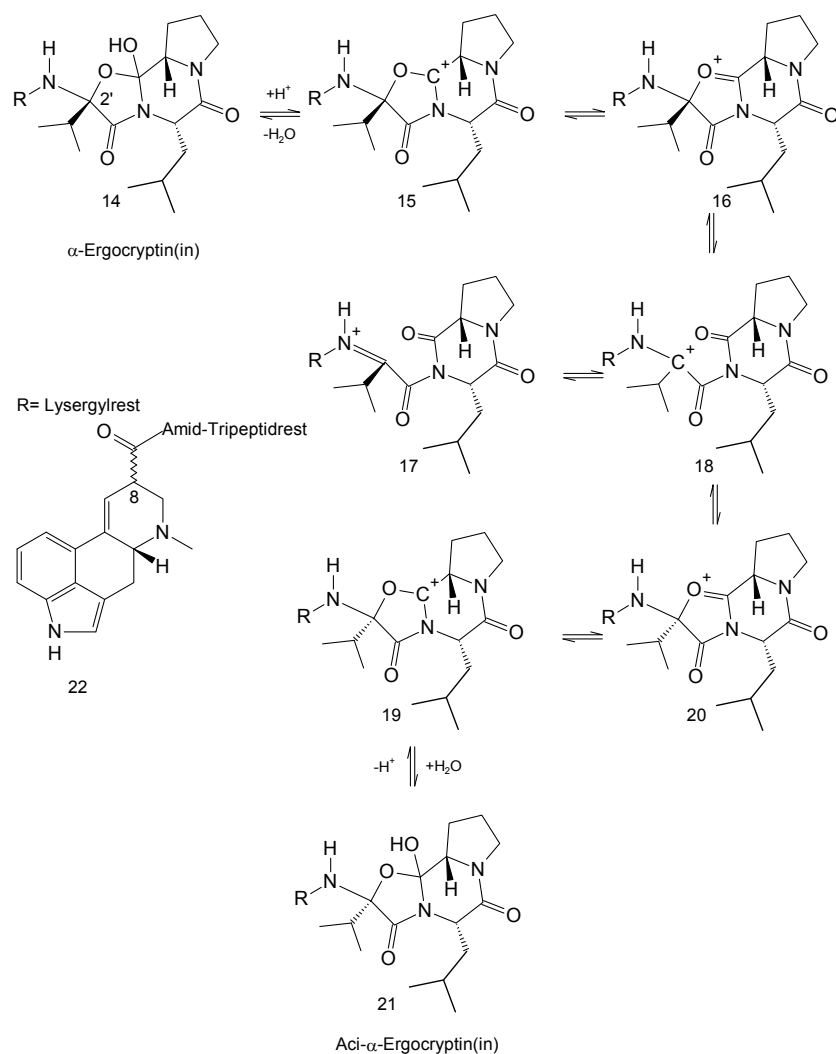


Abbildung 7: Schema der C2'-Epimerisierung zur Bildung von Aci-Ergotalkaloiden am Beispiel des α -Ergocryptin(in) [40].

2.3 Gesetzliche Regelungen

In der Europäischen Union sind derzeit keine Grenzwerte in der Kontaminanten-Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 [41] und seinen Aktualisierungen für den Ergotalkaloidgehalt in Lebensmitteln festgelegt. Es gibt jedoch gemäß Verordnung (EG) Nr. 824/2000 [42] eine Regelung für Interventionsgetreide. Interventionsgetreide ist Getreide, welches von der öffentlichen Hand gekauft und verkauft wird, um die Marktpreise stabil zu halten. An dieses Getreide werden besondere Qualitätsanforderungen gestellt [42], das heißt, es dürfen nur 0,05 % Mutterkorn in Brotgetreide (Hartweizen, Weizen und Roggen) enthalten sein. In der Verordnung (EG) Nr. 1784/2003 [43] wird empfohlen, die Intervention für Roggen auszusetzen, da sich große Mengen von Interventionsbeständen an Roggen angesammelt hatten. So wurde in der Verordnung (EG) Nr. 1068/2005 [44] festgelegt, dass für Roggen ab dem Geschäftsjahr 2004/05 die Intervention ausgesetzt wird. Gemäß der Verordnung (EG) Nr. 687/2008 [45] gelten die Regelungen bezüglich Mutterkorn in Interventionsgetreide nur noch für Hartweizen und Weichweizen.

Der Ergotalkaloidgehalt in Sklerotien liegt zwischen 0,01 und 0,5 % mit einem Mittelwert von 0,2 % [46] und ist damit großen Schwankungen unterlegen. Aus diesem Grund ist es schwierig, aus dem Gehalt an Mutterkorn in Getreide Rückschlüsse auf die Toxizität zu ziehen. Geht man jedoch von dem durchschnittlichen Ergotalkaloidgehalt in Sklerotien von 0,2 % und einem Höchstwert von 0,05 % an Sklerotien in Getreide aus, so ergibt sich ein Maximalwert von $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$ Gesamtergotalkaloidgehalt in Getreide [47].

Neben der Höchstgehalt-Regelung für Interventionsgetreide existiert in der EU auch eine Regelung für Futtermittel. So dürfen, gemäß der Futtermittelverordnung (FuttMV) [48] und der EG Richtlinie 2002/32/EG [49] über unerwünschte Stoffe in der Tiernahrung, Futtermittel, die ungemahlenes Getreide enthalten, maximal 0,1 % Mutterkorn beinhalten. Setzt man auch hier einen mittleren Ergotalkaloidgehalt von 0,2 % in Mutterkorn an, so ergibt sich ein Maximalwert von $2000 \mu\text{g kg}^{-1}$ Gesamtergotalkaloidgehalt in Futtergetreide.

Nach der Meinung des wissenschaftlichen Gremiums für Kontaminanten in der Nahrungskette der European Food Safety Authority (EFSA) ist die Bestimmung des Kontaminationsgrades über die Menge an Sklerotien in Getreide ungenau, da Größe, Gewicht und Zusammensetzung

der Sklerotien sehr unterschiedlich sind [50]. Aufgrund der zu geringen Datenbasis wurde darauf aufbauend 2012 eine Empfehlung der Europäischen Kommission (2012/154/EU) [51] mit der Aufforderung an die Mitgliedsländer herausgegeben, ein Monitoring von Ergotalkaloiden in Futter- und Lebensmitteln durchzuführen. Dabei sollten die Proben auf den Gehalt der sechs prioritären Ergotalkaloide sowie deren korrespondierenden (*S*)-Epimeren hin analysiert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass man in der EU künftig Grenzwerte basierend auf den tatsächlichen Ergotalkaloidgehalten festlegen möchte und nicht, wie bisher bei Interventionsgetreide üblich, aufgrund des Mutterkornanteils.

In Nicht-EU-Ländern gibt es bezüglich des Sklerotienanteils in Getreide ähnliche Regulierungen wie in der EU oder gar keine Beschränkungen. In der Schweiz dürfen in Brotgetreide max. 0,05 % Mutterkorn enthalten sein und in Getreide, welches direkt an den Verbraucher abgegeben wird, sogar nur 0,02 % (Verordnung des EDI über Fremd- und Inhaltsstoffe in Lebensmitteln vom 26.6.1995, Stand 7.5.2012) [52]. In den USA und Kanada dürfen maximal 0,03 % Mutterkorn in einem Kilogramm Getreide enthalten sein [1]. Bisher gibt es jedoch in keinem Land einen Grenzwert, der sich auf den tatsächlichen Ergotalkaloidgehalt und nicht auf den Sklerotienanteil in Getreide bezieht [1].

2.4 Ergotalkaloidgehalte in Mehl

Durch die im Abschnitt 1.1 beschriebene klimatische Abhängigkeit des Mutterkornbefalls von Getreide und des Ergotalkaloidhaltes in den Sklerotien sind die in verschiedenen Publikationen gefundenen Ergotalkaloidgehalte in Mehl und daraus hergestellten Getreideprodukten starken Schwankungen unterlegen. Aus einer Stellungnahme vom 22.01.2004 des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) [17] geht hervor, dass von der Bundesanstalt für Getreide-, Kartoffel- und Fettforschung (BAGKF) in vier Mehlen Gesamtergotalkaloidgehalte zwischen 2308 und 3138 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ermittelt wurden, in einem weiteren Mehl wurde der Gesamtergotalkaloidgehalt sogar mit 7255 $\mu\text{g kg}^{-1}$ bestimmt. Die in der Literatur genannten Ergotalkaloidgehalte in verschiedenen Mehlproben und Backwaren sind deutlich geringer als die vom BAGKF ermittelten Gehalte in Mehl [17]. Von Müller *et al.* [53] wurde bei 22 analysierten Roggenmehlproben aus den Jahren 2006/2007, mit einem Mittelwert von

137,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$, ein Maximalgehalt von 714,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Gesamtergotalkaloidgehalt) quantifiziert. Im Vergleich dazu haben Lauber *et al.* [54] für das Erntejahr 2003 einen Maximalgehalt von 3280 $\mu\text{g kg}^{-1}$ bei einem Mittelwert von 818 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (30 Proben) gefunden. Für das Erntejahr 2004 war der Gehalt deutlich geringer mit einem Maximalgehalt von 974 $\mu\text{g kg}^{-1}$ bei einem Mittelwert von 260 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (21 Proben). Aus diesen Werten kann man erkennen, dass die Gesamtergotalkaloidgehalte sowohl zwischen den Proben eines Jahres als auch zwischen den Jahren großen Schwankungen unterlegen sind. Aus diesem Grund ist eine generelle Aussage zur Ergotalkaloidbelastung von Mehl schwierig.

2.5 Abbau- und Epimerisierungsverhalten von Ergotalkaloiden bei der Verarbeitung von Getreide

Die Gehalte und die Epimerenverteilung der einzelnen Ergotalkaloide in Mehl und daraus hergestellten Lebensmitteln unterliegen großen Schwankungen [18,55,56,57]. Das Verhältnis von (*R*)- zu (*S*)-Epimer variierte beispielsweise bei 28 untersuchten Proben aus roggenbasierten Getreideprodukten von 0,1 in Crackern bis zu 6,0 in Roggenbrot [58] mit einem maximalen Ergotalkaloidgehalt von 340 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in Roggen-Knäckebrötchen. Durch die Verarbeitung von Mehl wurden einerseits ein Abbau und andererseits eine Verschiebung des Epimerenverhältnisses auf die Seite der biologisch nicht aktiven (*S*)-Epimere beobachtet. Hierbei wurde die Verarbeitung von ergotalkaloidhaltigem Mehl in Getreideprodukte wie Brot, Pfannkuchen, Nudeln oder Bier untersucht [59,60,61,62]. Ein kompletter Verlust aller Ergotalkaloide (es wurden nur die Gehalte der sechs prioritären (*R*)-konfigurierten Ergotalkaloide quantifiziert) resultierte aus dem Backen von Weizenvollkornbrot, wogegen es bei der Herstellung von Roggenbrot und Triticale-Pfannkuchen nur zu einem Abbau von 85 % bzw. 74 % kam [59]. Ein 25%iger Abbau bei Quantifizierung der (*R*)-konfigurierten prioritären Ergotalkaloide wurde beim Backen von Roggenbrötchen beobachtet [60]. Die Verarbeitung von Mehl zu orientalischen Nudeln oder Spaghetti führte jeweils zu einem Abbau von 11-46 % bzw. 20-42 % [61]. Dagegen kam es zu einem 25%igen Abbau bei der Herstellung von Kastenbrot (nur (*R*)-Epimere der prioritären Ergopeptine) [61]. Bei der Bierherstellung waren 2 % des ursprünglichen Ergotalkaloidgehaltes (nur (*R*)-Epimere der prioritären Ergopeptine) im Bier nachweisbar. Da bei den bisher genannten Verarbeitungsprozessen nur die (*R*)-Epimere betrachtet wurden, kann der festgestellte Verlust durch Abbauprozesse

und/oder durch eine Verschiebung des Epimerenverhältnisses auf die Seite der (*S*)-Epimere entstanden sein. Publikationen, in denen beide Epimere betrachtet wurden, beschreiben alle eine Verschiebung des Epimerenverhältnisses auf die Seite der (*S*)-Epimere [47,63,64]. So wurde eine Verschiebung des Epimerenverhältnisses der Ergopeptine nach einer thermischen Behandlung bei 200 °C für 10 min beobachtet, wogegen keine Epimerisierung für das einfache Lysergsäureamid Ergometrin festgestellt werden konnte [64]. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine thermische Behandlung zu einer Detoxifizierung von mit Ergotalkaloiden belasteten Proben führt. Dennoch muss eine Toxifizierung durch Verschiebung des Epimerenverhältnisses auf die Seite des toxikologisch relevanten (*R*)-Epimers in Betracht gezogen werden [65].

2.6 Strukturelle Charakterisierung von Ergotalkaloiden

Die räumliche Struktur von chemischen Verbindungen lässt sich anhand einer Kristallstruktur beschreiben. Für die unterschiedlichen Eigenschaften, wie beispielsweise die Polarität der verschiedenen Ergotalkaloide sowie die Toxizität der Epimerenpaare, können Unterschiede in der Struktur verantwortlich sein. In der Literatur sind von den (*R*)-konfigurierten Ergotalkaloiden, der durch den Pilz *C. purpurea* hauptsächlich gebildeten Ergotalkaloide, mehrere Kristallstrukturen verfügbar [66,67,68,69,70,71], jedoch nur eine Struktur eines (*S*)-konfigurierten Ergotalkaloids, die des α -Ergocryptinins [72]. Auffällig ist, dass in allen Strukturen der (*R*)-konfigurierten Verbindungen Lösungsmittel oder andere organische Verbindungen koordiniert werden, wogegen das (*S*)-konfigurierte α -Ergocryptinin lösungsmittelfrei kristallisiert. Da in der Literatur keine Kristallstrukturen beider epimerer Formen ein und desselben Ergotalkaloids zu finden sind, lassen sich keine generellen Aussagen zu Zusammenhängen zwischen Struktur und Eigenschaften treffen.

2.7 Analysenverfahren zur epimerenspezifischen Quantifizierung von Ergotalkaloiden

Zur Quantifizierung der verschiedenen Ergotalkaloide in komplexen Gemischen oder Matrices ist eine Auftrennung der Substanzgemische erforderlich. Bethke *et al.* [35] verwendete 1976 eine Umkehrphasen-Flüssigchromatographie (RP-Flüssigchromatographie) und quantifizierte damit den Ergotamingehalt in pharmazeutischen Präparaten. Die HPLC etablierte sich

als die am besten geeignete Methode zur Auftrennung der verschiedenen Ergotalkaloide aus komplexen Substanzgemischen. Mit Hilfe der HPLC in Verbindung mit einem Fluoreszenzdetektor konnte der Gehalt der sechs prioritären toxikologisch relevanten (*R*)-Epimere in Mehl und Getreideprodukten quantifiziert werden [59,73]. Da die biologisch nicht aktiven (*S*)-Epimere in dem in dieser Arbeit entwickelten Analysenverfahren auch erfasst werden sollten, wird nachfolgend nur auf Verfahren zur epimerenspezifischen Quantifizierung näher eingegangen. Die verschiedenen in der Literatur präsentierten Analysenverfahren unterscheiden sich in der Probenvorbereitung sowie in der instrumentellen Analyse. Tabelle 2 gibt einen Überblick über Analysenverfahren für die Ergotalkaloidanalytik, mit denen es möglich ist, die (*R*)- und (*S*)-Epimere separat voneinander zu quantifizieren. Dabei werden zur Extraktion der Ergotalkaloide aus der Matrix entweder saure oder basische Lösungsmittelgemische verwendet. Alle bis auf eines [74] der aufgeführten Verfahren verwenden nach der Extraktion der Ergotalkaloide aus der Matrix ein Aufreinigungsverfahren (Clean-up). Hierbei gibt es verschiedene Möglichkeiten, die Matrix abzutrennen. Zum einen kann die Matrix an eine feste Phase gebunden werden, wobei die Analyten nicht mit dieser Phase wechselwirken [53,75,76]. Eine andere Möglichkeit besteht darin, den Analyten fest an eine Phase zu binden, gefolgt von der Elution der Matrixbestandteile. Anschließend können die Analyten von der festen Phase ohne Matrixbestandteile eluiert werden [77,78,79]. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von Zwei-Phasen-Gemischen, wobei sich Matrixbestandteile in einer anderen Phase als die Analyten anreichern und dadurch abgetrennt werden können [80]. Alle in der Literatur beschriebenen Clean-up-Methoden arbeiten unter basischen oder sauren Bedingungen.

Wichtig bei der Probenvorbereitung ist neben der möglichst vollständigen Abtrennung von Matrixbestandteilen die epimerisierungsfreie Lagerung der Ergotalkaloidextrakte vor der Analyse. Werden mehrere Proben gleichzeitig aufgearbeitet, kann bei einer großen Probenanzahl, je nach Zeitbedarf der chromatographischen Methode, eine Probenlagerung über mehrere Tage nötig sein. Vor diesem Hintergrund hat die Zusammensetzung des Lösungsmittels, in welchem die Ergotalkaloidextrakte vorliegen, eine besondere Bedeutung. Kommt es in dem Lösungsmittel zu einer schnellen Epimerisierung, kann dieses zu verfälschten Analyseergebnissen führen. So wurde beispielsweise von Bockhorn *et al.* [74] schon nach kurzer Zeit eine Epimerisierung beobachtet.

Zur Einordnung der in Tabelle 2 gezeigten Wiederfindungsraten können die Vorgaben der Europäischen Union für andere Mykotoxine herangezogen werden, bei denen bereits Grenzwerte festgelegt sind. In der Verordnung EG 401/2006 [81] sind die Kriterien der Analysenverfahren für die Mykotoxine festgelegt, welche der offiziellen Kontrolle unterliegen. So liegen die geforderten Wiederfindungsraten je nach Mykotoxin und Analytgehalt zwischen 50 und 130 %, was alle hier aufgelisteten Analysenverfahren erfüllen. Die Detektion der Ergotalkaloide nach der chromatographischen Trennung kann zum einen aufgrund der natürlichen Fluoreszenz der Analyten mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors (FLD) erfolgen. Zum anderen ist die Quantifizierung über eine massenspektrometrische Detektion möglich. Beide Methoden zeigen ähnliche Bestimmungsgrenzen (BG) (Tabelle 2). Für die zum Einsatz kommenden Detektionsmethoden ist ein Clean-up von Vorteil. Bei der Verwendung eines FLD als Detektor kann nicht abgetrennte fluoreszierende Matrix Analytsignale überlagern und dadurch zu falschen Ergebnissen führen. Bei der massenspektrometrischen Detektion können nicht abgetrennte Matrixbestandteile eine Ionensuppression oder eine Ionenverstärkung bewirken. Zur Vermeidung dieser Effekte kann beispielsweise die Stabilisotopenverdünnungsanalyse angewendet werden [82]. Diese setzt allerdings die Verwendung von isotopenmarkierten Standardverbindungen voraus, welche für Ergotalkaloide bislang nicht kommerziell verfügbar sind.

Tabelle 2: Zusammenfassung von Analysenverfahren zur epimerenspezifischen Quantifizierung von Ergotalkaloiden.

Probenvorbereitung			Instru- mentelle Analyse	Bestimmungs- grenze [µg kg ⁻¹]	Wiederfin- dungsrate in Roggen [%]	Autor
Extraktionslösungsmittel	Clean-up	Lösungsmittel Probenlagerung				
Basischer pH-Wert						
Ethylacetat, Methanol, Ammoniumhydroxidlösung	Basisches Aluminiumoxid	Acetonitril, Ammoniumcarbamatpuffer	HPLC-FLD	0,08 - 3,30	89,3 - 99,8*	Müller <i>et al.</i> [53]
Acetonitril, Ammoniumcarbonatpuffer	Dispersive Festphasenextraktion mit PSA	Acetonitril, Ammoniumcarbonatpuffer	HPLC-MS/MS	0,17 - 2,78	69 - 105** 70-110***	Krska <i>et al.</i> [75] Crews <i>et al.</i> [58]
Ammoniakalisches Ethylacetat	-	Ammoniumacetat, Methanol, Acetonitril	HPLC-MS/MS	k. A.	k. A.	Bockhorn <i>et al.</i> [74]
Acetonitril, Ammoniumcarbonatpuffer	Mycosep-Column	Acetonitril, Ammoniumcarbonatpuffer	UPLC-MS/MS	0,01 - 10	59 - 130	Kokkonen <i>et al.</i> [76]
Ethylacetat, Methanol, Ammoniumhydrogencarbonat	Phasentrennung durch Zugabe von Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer und gesättigter Ammoniumsulfatlösung	Methanol, Acetonitril, Wasser	HPLC-MS/MS	0,15 - 0,96	68 - 79	Di Mavungu <i>et al.</i> [80]
Dichlormethan, Ethylacetat, Methanol, Ammoniak	Extrelut-Säule, Elution basisch	Acetonitril, Wasser	HPLC-FLD	1,8 - 12	64 - 97	Klug <i>et al.</i> [77]
Saurer pH-Wert						
Methanol, Phosphorsäurelösung	SPEC PLUS H ⁺ -SCX-Säulen Beladung sauer, Elution basisch	Acetonitril, Ammoniumcarbamat-Puffer	HPLC-FLD	0,7 - 3,3	55 - 67****	Storm <i>et al.</i> [78]
Acetonitril, PBS-Puffer (pH-Wert 6,0)	H ⁺ -SCX-SPE, Beladung sauer, Elution basisch	Stabilisierungslösung(Ethylenglycol, Propandiol, Weinsäure, Ethanol, Wasser)	HPLC-FLD	0,16 - 0,77	84,0 - 123,5	Curtui <i>et al.</i> [79]

*nur für (R)-Epimere, ohne Ergosin, **für zehn verschiedene Matrices, ***für Weizenmehl, ****jeweils für Summe aus (R)- und (S)-Epimeren, ohne Ergosin(in)

3 Problemstellung und Zielsetzung

Ein Analysenverfahren zur epimerenspezifischen Quantifizierung der Ergotalkaloidgehalte, bei welchem die Epimerisierung nicht minimiert wird, führt im Ergebnis zu einer anderen Ergotalkaloidverteilung als in der originären Probe. Aussagen über die Menge an toxischen (*R*)-konfigurierten Ergotalkaloiden in der Probe können dann nicht mehr getroffen werden. Das Ziel dieser Arbeit war daher die Entwicklung eines Analysenverfahrens, das die Epimerisierung bei der Probenvorbereitung im Vergleich zu bestehenden Verfahren deutlich verringert. Dabei sollte das Analysenverfahren durch die Verwendung einer Kationenaustauscherharz-Festphasenextraktion praktikabel, schnell und einfach in der Handhabung sein. Voraussetzung für ein solches Analysenverfahren war die Identifizierung geeigneter Lösungsmittelgemische, in denen die Epimerisierung unterbunden wird bzw. minimal ist. Über die Untersuchung des Epimerisierungsverhaltens von Ergotalkaloiden in diesen Lösungsmitteln in Kombination mit theoretischen Berechnungen sollten auch Aussagen zur Einstellung der Epimerengleichgewichte möglich sein. Die Anwendbarkeit sollte über eine Validierung des Analysenverfahrens für zwei unterschiedliche Matrices demonstriert werden. Als erste Matrix diente die in der Ergotalkaloidanalytik hoch relevante Matrix Roggenmehl. Roggen ist im Vergleich zu den meisten anderen Getreidesorten ein Fremdbefruchter und zeigt aus diesem Grund eine besonders hohe Anfälligkeit für den Befall mit *C. purpurea*. Als zweite Matrix diente Weizenkeimöl. Diesem kommt eine besondere Bedeutung zu, da es zur Deckung des Bedarfs an essentiellen Fettsäuren im Kinder und Jugendalter [83] oder zum Ausgleich des Vitamin E Haushalts bei stillenden Müttern [84] empfohlen wird. Da Weizenkeimöl noch nie auf seinen Ergotalkaloidgehalt hin analysiert wurde, sind Aussagen zu dessen Belastung bislang nicht möglich.

Die Verarbeitung von mit Mutterkorn kontaminiertem Mehl kann eine Verschiebung des Epimerenverhältnisses der Ergotalkaloide bewirken, was zu einer Toxifizierung oder Detoxifizierung führt. Die Aussagen hierzu in der Literatur sind widersprüchlich (Abschnitt 2.5) und sollten durch eigene Experimente anhand von Backversuchen nachvollzogen werden. Ob es durch den Verdauungsprozess zu einer Umwandlung der verschiedenen Ergotalkaloidepimere kommt, wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. Die sauren bzw. basischen Bedingungen, die in den verschiedenen Abschnitten des Verdauungstraktes

vorherrschen, können eine Epimerisierung beschleunigen. Daneben sind auch enzymatische Prozesse denkbar, die sich auf die Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen den (*R*)- und (*S*)-Epimeren auswirken und zu einer Toxifizierung führen können. Die Untersuchung des Epimerisierungsverhaltens von Ergotalkaloiden im Verdauungsprozess sollte über die Simulation in einem *in vitro* Modell nachgestellt werden. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse können Hinweise geben, ob durch Prozesse im Verdauungstrakt eine Toxifizierung durch Umwandlung der biologisch inaktiven (*S*)-konfigurierten Ergotalkaloide in ihre toxischen (*R*)-Epimere stattfindet. Daneben war es das Ziel der Arbeit, die Frage zu beantworten, ob ein Analysenverfahren, welches nur die toxikologisch relevanten (*R*)-Epimere quantifiziert, für eine Bewertung eines Lebensmittels hinsichtlich seiner toxikologischen Wirkung genügt.

Ergotalkaloide sind photolabile Verbindungen und reagieren unter dem Einfluss von UV-Licht mit nukleophilen Substanzen zu Ergotalkaloid-Konjugaten. Diese Konjugate werden von der Ergotalkaloidanalytik, welche nur die ursprünglichen Ergotalkaloide quantifiziert, nicht erfasst, so dass keine Aussage getroffen werden kann, ob und in welcher Menge diese Verbindungen in Mutterkorn bzw. Mehl oder Lebensmitteln zu finden sind. Da Ergotalkaloid-Konjugate, wie beispielsweise Lumi-Ergometrin (Abschnitt 2.2), toxikologisch wirksam sein können, ist ihre Identifizierung und Quantifizierung in realen Proben von hoher Wichtigkeit. Als nukleophile Verbindungen, die in realen Proben Konjugationsverbindungen mit Ergotalkaloiden bilden können, sind Wasser oder Fettsäuren denkbar, die in Sklerotien vorkommen. Beispielfhaft sollten verschiedene Ergotalkaloide mit den Fettsäuren Linol- und Ricinolsäure und Ergometrin mit Wasser zu Lumi-Ergometrin umgesetzt und charakterisiert werden. Diese Verbindungen können mit einer zu entwickelnden HPLC-MS/MS-Methode in realen Proben nachgewiesen werden. Neben den hier nur beispielhaft zu untersuchenden Ergotalkaloid-Fettsäure-Konjugaten sind viele weitere Kombinationen aus verschiedenen Ergotalkaloiden und einer großen Menge unterschiedlicher Fettsäuren bzw. nukleophiler Substanzen denkbar. Die Summe dieser Verbindungen kann zu einer hohen Belastung von Lebensmitteln führen. Vor allem vor dem Hintergrund einer möglichen toxikologischen Relevanz haben diese Substanzen einen hohen Stellenwert für die Ergotalkaloidanalytik.

4 Material und Methoden

4.1 Chemikalien und Materialien

4.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 3 angegeben.

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Reinheitsgrad/Spezifikation	Hersteller
Aceton	HPLC-grade	LAB-SCAN
Acetonitril	HPLC-grade	LAB-SCAN
Ammoniumcarbamat	99 %	ABCR GmbH & Co. KG
Ammoniumcarbonat	p.a.	Merck KGaA
Ammoniumformiat	p.a.	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ammoniumhydroxid-Lösung	25 %, p.a.	Merck KGaA
Ammoniumhydroxid-Lösung	28 %, p.a.	Merck KGaA
Calciumchlorid Dihydrat	p.a.	Merck KGaA
Ergocornin	> 95 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ergocornin*	k.A.	ALFARMA s.r.o.
Ergocorninin*	k.A.	ALFARMA s.r.o.
Ergocristin*	k.A.	ALFARMA s.r.o.
Ergocristinin*	k.A.	ALFARMA s.r.o.
Ergometrin-Hydrogenmaleat*	k.A.	ALFARMA s.r.o.
Ergometrinin*	k.A.	ALFARMA s.r.o.
Ergometrin-Maleat	k.A.	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ergosin*	k.A.	ALFARMA s.r.o.
Ergosinin*	k.A.	ALFARMA s.r.o.
Ergotaminin*	k.A.	ALFARMA s.r.o.
Ergotamin-Tartrat	k.A.	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ergotamin-Tartrat*	k.A.	ALFARMA s.r.o.
Ethylacetat	HPLC-grade	LAB-SCAN
Galle	vom Schwein, lyophilisiert	Santa Cruz Biotechnology
Harnsäure	Molecular biology grade	Applichem GmbH
Harnstoff	mind. 99,5 %	Applichem GmbH
Kaliumchlorid	p.a.	Merck KGaA
Kaliumdihydrogenphosphat	p.a.	Merck KGaA
Linolsäure	≥ 99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Lysergol	97 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Chemikalie	Reinheitsgrad/Spezifikation	Hersteller
Magnesiumchlorid Hexahydrat	p.a.	Mallinckrodt Baker B.V.
Methanol	HPLC-grade	LAB-SCAN
Mucin	aus dem Schweinemagen, Typ III	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natrium-1-butansulfonat	wasserfrei, für die IPC	Applichem GmbH
Natrium-1-hexansulfonat	wasserfrei, für die IPC	Applichem GmbH
Natrium-1-pentansulfonat	wasserfrei, für die IPC	Applichem GmbH
Natriumchlorid	p.a.	Merck KGaA
Natriumhydrogencarbonat	p.a.	Merck KGaA
Natriumsulfat	p.a.	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumthiocyanat	mind. 98 %	Mallinckrodt Baker B.V.
Natronlauge	p.a.	Applichem GmbH
Pankreatin	aus Schweinepankreas, $\geq 3 \times$ USP specifications	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Pepsin	aus Schweinemagen, 0,8 FIP-U mg^{-1}	Applichem GmbH
<i>p</i> -Toluolsulfonsäure, polymergebunden	makroporös, Partikelgröße 30-60 mesh (250-595 μm), Kapazität 2,76 mmol g^{-1}	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ricinolsäure	$\geq 99 \%$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Salzsäure	konz., p.a.	Merck KGaA
Trypsin	aus Schweinepankreas, BAEE 260 USPU mg^{-1}	Applichem GmbH
Zucker		lokaler Supermarkt
α -Amylase	aus Schweinepankreas, Typ VI-B, $\geq 21,6$ units mg^{-1}	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
α -Ergocryptin	k.A.	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
α -Ergocryptin*	k.A.	ALFARMA s.r.o.
α -Ergocryptinin*	k.A.	ALFARMA s.r.o.

* eingesetzte Kalibranten

4.1.2 Geräte, Verbrauchsgegenstände und Software

Die verwendeten Geräte und Verbrauchsgegenstände sind in Tabelle 4 dargestellt. Die verwendete Software ist in Tabelle 5 aufgeführt. Zur Durchführung von statistischen Berechnungen und Datenauswertungen wurde die Software Statist verwendet. Die Datenauswertung von instrumentellen Messungen erfolgte mit der zum jeweiligen Gerät gehörenden Software (Tabelle 5).

Tabelle 4: Verwendete Geräte und Verbrauchsgegenstände.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller	Sitz der Firma	
			Ort	Land
HPLC Agilent 1200er Series	Degasser	Agilent Technologies Deutschland GmbH	Böblingen	Deutschland
	Binäre Pumpe			
	Autosampler			
	Säulenofen			
	Fluoreszenzdetektor			
	UV-Detektor			
HPLC Agilent 1200er Series Massenspektrometer	Degasser	Agilent Technologies Deutschland GmbH	Böblingen	Deutschland
	Binäre Pumpe			
	Autosampler			
	Säulenofen			
	Fluoreszenzdetektor			
	Massenspektrometer	4000 QTRAP® AB SCIEX Germany GmbH	Darmstadt	Deutschland
HPLC Thermo	Degasser	SCM1000	San Jose	USA
	Quarternäre Pumpe	P4000		
	Autosampler	AS3000		
	Diodenarray Detektor	6000LP		
	Säulenofen	Jetstream 2 Plus		
HPLC Knauer	Autosampler	3950	Berlin	Deutschland
	Pumpe	1800		
	UV-Detektor	200		
Analysenwaage	LA230S	Sartorius AG	Göttingen	Deutschland
Backmeister	Typ BTO 21613-S	Daub Backtechnik GmbH	Hamburg	Deutschland
Basische Al ₂ O ₃ Säulen	Sep-Pak Alumina B	Waters Corporation	Milford	USA
Braun 1 mL Spritzen	Omnifix®-F, 1 mL	B. Braun Melsungen AG	Melsungen	Deutschland

Gerät	Bezeichnung	Hersteller	Sitz der Firma	
			Ort	Land
Diffraktometer	Enraf-Nonius CAD-4	Enraf-Nonius B.V.	Rotterdam	Niederlande
Diffraktometer	APEXII	Bruker AXS GmbH	Karlsruhe	Deutschland
Fraktionssammler	Foxy R1	Teledyne ISCO	St. Lincoln	USA
Gärschrank	Typ G 86 W	MANZ Backtechnik GmbH	Creglingen	Deutschland
Horizontalschüttler	HS501 digital	IKA®-Werke GmbH & Co. KG	Staufen	Deutschland
Magnetrührer	Cimarex i Poly 15	Thermo Scientific Inc.	Waltham	USA
Orbitrap	Exactive Orbitrap	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham	USA
pH-Meter	CG 837	Schott Instruments GmbH	Mainz	Deutschland
Safe Lock Gefäße™	2 mL, ambra	Eppendorf AG	Hamburg	Deutschland
Schlagmühle	M 20 Universalmühle	IKA®-Werke GmbH & Co. KG	Staufen	Deutschland
Seralwasseranlage	Seralpur PRO 90CN	Seral GmbH	Ransbach-Baumbach	Deutschland
Sieb	Analysensieb 250 µm	F. Kurt Retsch GmbH & Co. KG	Haan	Deutschland
Spiralkneter	Typ SP 8	Diosna GmbH	Osnabrück	Deutschland
Spritzenvorsatzfilter	CHROMAFIL® A-20/25	PTFE Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	Düren	Deutschland
Spritzenvorsatzfilter	CHROMAFIL® A-20/3	PTFE Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	Düren	Deutschland
Spritzenvorsatzfilter	CHROMAFIL® 45/25	PVDF Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	Düren	Deutschland
Thermostat	Thermo Haake	DC10-K10 Thermo Fischer Scientific Inc.	Karlsruhe	Deutschland
Trockenschrank	T6120	Heraeus GmbH	Hanau	Deutschland
Überkopfschüttler	REAX 20/8	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG	Schwabach	Deutschland
Ultraschallbad	BANDELIN SONOREX	RK 100 BANDELIN electronic GmbH & Co. KG	Berlin	Deutschland
UV-Lampe	Universal UV-Lampe	TL-900 CAMAG AG	Muttenz	Schweiz
Vakuum-Kammer	SPE 24G	Avantor Performance Materials	Griesheim	Deutschland
Vials braunglas	Gewindeflaschen ND8	1,5 mL beoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH	Heidelberg	Deutschland
Vortexschüttler	lab dancer	IKA®-Werke GmbH & Co. KG	Staufen	Deutschland
Zentrifugalmühle	ZM1000, Apertur 250 µm	Retsch GmbH	Hahn	Deutschland

Gerät	Bezeichnung	Hersteller	Sitz der Firma	
			Ort	Land
Zentrifuge	Minispin [®] Plus	Eppendorf AG	Hamburg	Deutschland
Zentrifuge Sigma	6K 15	Sigma Laborzentrifugen GmbH	Osterode am Harz	Deutschland
Zentrifugenröhrchen	15 mL	Orange Scientific NV/SA	Braine-l'Alleud	Belgien
Zentrifugenröhrchen	50 mL	Orange Scientific NV/SA	Braine-l'Alleud	Belgien

Tabelle 5: Verwendete Software.

Software	Messgerät	Hersteller	Sitz der Firma	
			Ort	Land
ACD/ChemSketch 12.00		Advanced Chemistry Development, Inc.	Toronto	Kanada
Analyst 1.5	HPLC Agilent Massenspektrometer	AB SCIEX Germany GmbH	Darmstadt	Deutschland
Chemstation B.02.01-SR2	HPLC Agilent	Agilent Technologies Deutschland GmbH	Böblingen	Deutschland
Chromgate Version 3.1.6	HPLC Knauer	Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH	Berlin	Deutschland
Chromquest 4.2.34	HPLC Thermo	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham	USA
Microsoft Office Standard 2007		Microsoft Corporation	Redmond	USA
Origin 8.5. OG SR1		OriginLab Corporation	Nordhampton	USA
Statist 2.0, Rev. 4c		Georg Schmitt/Michael Herbold (ab 2004 AVRECON GmbH), Institut für Rechts- medizin der Universität Heidelberg	Walldorf	Deutschland
Thermo Xcalibur [™] Version 2.2	Orbitrap	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham	USA

4.2 Methoden

4.2.1 Chromatographische Methoden

Die verwendeten Chromatographischen Methoden sind in Tabelle 6 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 6: Zusammenfassung der verwendeten Chromatographischen Methoden.

#	Lösungsmittel		Säule	Vorsäule	Gradient/Fluss			Säulen- ofentem- peratur [°C]	Injek- tions- volumen [μL]	HPLC	Detek- tor
	A	B			Zeit [min]	Lösungs- mittel B [%]	Flussrate [mL min ⁻¹]				
A	Wasser + 200 mg L ⁻¹ Ammoniumcarbammat	Acetonitril	Phenomenex Luna C6-Phenyl (250 × 4,6 mm, Partikelgröße 5 μm)	Phenomenex Luna C6-Phenyl (4 × 3,0 mm, Partikelgröße 5 μm)	0-17	50	0,8	30	20	Agilent	FLD*
					17-37	50	1,5				
B	Wasser + 200 mg L ⁻¹ Ammoniumcarbammat	Acetonitril	Phenomenex Luna C6-Phenyl (250 × 4,6 mm, Partikelgröße 5 μm)	Phenomenex Luna C6-Phenyl (4 × 3,0 mm, Partikelgröße 5 μm)	0-17	50	0,8	30	10	Agilent	FLD*
					17-37	50	1,5				
C	Wasser + 0,05 % Ammoniumhydroxidlö- sung	Acetonitril	Phenomenex Gemini C18 (150 × 2 mm, Partikelgröße 3 μm)	Phenomenex Gemini C18 (4 × 2,0 mm, Partikelgröße 3 μm)	0-8	80-100	0,3	30	5	Agilent	MS
					8-15	100	0,3				
					15-25	80	0,3				
D	Wasser + 0,05 % Ammoniumhydroxidlö- sung	Acetonitril	Phenomenex Gemini C18 (150 × 2 mm, Partikelgröße 3 μm)	Phenomenex Gemini C18 (4 × 2,0 mm, Partikelgröße 3 μm)	0-11	10-55	0,3	30	1	Agilent	MS
					11-20	100	0,3				
					20-30	10	0,3				

#	Lösungsmittel		Säule	Vorsäule	Gradient/Fluss			Säulen- ofentem- peratur [°C]	Injek- tions- volumen [µL]	HPLC	Detek- tor
	A	B			Zeit [min]	Lösungs- mittel B [%]	Flussrate [mL min ⁻¹]				
E	Wasser + 200 mg L ⁻¹ Ammoniumcarbonat	Acetonitril	Phenomenex Gemini C18 (150 × 2 mm, Partikelgröße 3 µm)	Phenomenex Gemini C18 (4 × 2,0 mm, Partikelgröße 3 µm)	0-4	15-36	0,3	30	10	Agilent	FLD*
					4-20	46-60	0,3				
					20-22	60-100	0,3				
					22-30	100	0,3				
					30-40	15	0,3				
F	Wasser + 0,05 % Ammoniumhydroxidlö- sung	Methanol	Knauer Eurospher II 100-5 C18H (150 × 20 mm, Partikelgröße 5 µm)		0-10	90	24,0	Raum- tempera- tur	500	Knauer	DAD
G	Wasser + 0,05 % Ammoniumhydroxidlö- sung	Methanol	Knauer Eurospher II 100-5 C18H (150 × 20 mm, Partikelgröße 5 µm)		0-10	94	24,0	Raum- tempera- tur	500	Knauer	DAD
H	Wasser + 0,05 % Ammoniumhydroxidlö- sung	Methanol	Knauer Eurospher II 100-5 C18H (150 × 20 mm, Partikelgröße 5 µm)		0-10	95	24,0	Raum- tempera- tur	500	Knauer	DAD
I	Wasser	Methanol	Zorbax Eclipse XDB C-18 (150 × 4,6 mm, Partikelgröße 4,6 µm)		0-8	45	1,0	30	100	Finni- gan	DAD
J	Wasser + 0,05 % Ammoniumhydroxidlö- sung	Acetonitril	Zorbax Eclipse XDB C-18 (150 × 4,6 mm, Partikelgröße 4,6 µm)		0-9	20	1,0	30	100	Finni- gan	DAD

* $\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 415 \text{ nm}$

4.2.2 Experimente zum Epimerisierungsverhalten von Ergotalkaloiden in verschiedenen Lösungsmittelgemischen

Zur Untersuchung des Epimerisierungsverhaltens der Ergotalkaloide Ergocornin und α -Ergocryptin wurden Lösungen durch Auflösung der Feststoffe von Ergocornin, Ergocorninin, α -Ergocryptin und α -Ergocryptinin mit einem jeweiligen Gehalt von 20 mg kg^{-1} in Acetonitril hergestellt. Diese Lösungen wurden mit Acetonitril verdünnt, so dass Stammlösungen aller vier Verbindungen mit Gehalten von jeweils $500 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ erhalten wurden. Zur Herstellung der Messlösungen wurden Aliquote der Stammlösungen im Stickstoffstrom bis zur Trockne eingeeengt. Unmittelbar vor der instrumentellen Messung wurden die eingedampften Standards in dem jeweiligen Lösungsmittelgemisch (Abbildung 9) aufgenommen, mit einem Vortexschüttler für 30 s geschüttelt und injiziert. Die Quantifizierung der Ergotalkaloidgehalte erfolgte über eine externe Kalibrierung. Hierfür wurden 6-Punkt-Kalibriergeraden in Acetonitril aus den Stammlösungen durch Einengen im Stickstoffstrom erstellt. Es wurde ein lineares Regressionsmodell verwendet. Die Messungen erfolgten mit Hilfe der Methode E (Tabelle 6). Die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten k und k' über die nichtlineare Kurvenanpassung erfolgte über die Software Origin.

4.2.3 Probenvorbereitung zur epimerenspezifischen Ergotalkaloidquantifizierung

4.2.3.1 Herstellung von Na^+ -SCX SPE-Kartuschen

Da die für das Festphasen-Clean-up verwendeten SPE-Kartuschen nicht kommerziell erhältlich waren, wurden diese selbst hergestellt. Hierfür wurde im ersten Schritt das H^+ beladene makroporöse Kationenaustauscherharz mit Na^+ -Ionen beladen. Es wurden 20 g Harz in eine Glassäule gefüllt und nacheinander mit jeweils 400 mL Methanol, 200 mL Acetonitril und 200 mL Aceton gewaschen. Anschließend wurde das Harz unter vermindertem Druck getrocknet. Im nächsten Schritt wurde der Kationenaustauscher mit H^+ unter Verwendung von 500 mL 4%iger Salzsäure beladen. Im Anschluss daran wurde das Harz mit 1500 mL Wasser neutral gewaschen. Nun erfolgte die Beladung mit Na^+ mit Hilfe von 500 mL 4%iger Natronlauge. Anschließend wurde das Harz mit 1500 mL Wasser neutral gewaschen und danach unter vermindertem Druck getrocknet. Im letzten Schritt wurde der Kationenaustauscher mit 100 mL Aceton gespült und im Anschluss daran nochmals unter vermindertem Druck ge-

trocknet. Alle Lösungsmittel wurden in einer Tropfgeschwindigkeit von 1 - 2 Tropfen pro Sekunde über das Harz geleitet.

Das Na⁺ beladene Harz wurde mit Hilfe von Mörser und Stößel gemahlen. Durch anschließendes Sieben konnten Harzpartikel mit einer Korngröße zwischen 100 und 200 µm erhalten werden. Zur Herstellung der SPE-Kartuschen wurde Quarzwolle als Filtermaterial in 1 mL Spritzen gefüllt. Anschließend wurden 200 ± 5 mg des gemahlenen Na⁺ beladenen Kationenaustauschermaterials in die Kartuschen gefüllt.

4.2.3.2 Probenvorbereitung von Roggenmehl

Zur Analyse von Realproben wurden vier verschiedene Roggenmehle in lokalen Supermärkten gekauft. 10,0 ± 0,5 g Roggenmehl wurden in ein 240 mL Zentrifugenglas eingewogen. Dazu wurden 50 mL Acetonitril:Wasser (84:16, v:v) gegeben und für 60 min bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei 300 min⁻¹ geschüttelt. Anschließend wurde bei 2605 × g für 10 min bei 20 °C zentrifugiert. Danach wurden 4 mL des Extraktes über einen 0,2 µm PTFE-Spritzenvorsatzfilter (A-20/25) filtriert und auf die zuvor mit 1 mL Acetonitril:Wasser (84:16, v:v) vorkonditionierte Na⁺-SCX SPE-Kartusche gegeben. Der Extrakt wurde in einer Zeit von mindestens 15 min über die Säule geleitet. Im Anschluss daran wurde die Säule mit 5 mL Acetonitril:Wasser (84:16, v:v) über 15 min gespült. Der aufgefangene Extrakt und die Spüllösung wurden verworfen. Im nächsten Schritt erfolgte die Elution der Ergotalkaloide mit 4 mL einer 352 mM Lösung von Natriumhexansulfonat in Acetonitril:Wasser (84:16, v:v). Die Elutionslösung wurde in einer Zeit von mindestens 15 min über die SPE-Kartusche geleitet und die Lösung in 8 mL Braunglasflaschen aufgefangen. Anschließend wurde ein Aliquot von 1,5 mL der erhaltenen Lösung mit Hilfe eines 0,2 µm PTFE-Spritzenvorsatzfilters (A-20/3) in Braunglasvials filtriert und bei -25 °C gelagert. Die instrumentelle Analytik erfolgte mit der in Tabelle 6 angegebenen Methode A.

4.2.3.3 Probenvorbereitung von Weizenkeimöl

Es wurden vier verschiedene Weizenkeimöle zur Quantifizierung ihrer Ergotalkaloidgehalte in lokalen Supermärkten gekauft. Zu 1 mL Weizenkeimöl wurden 5 mL Aceton hinzugegeben und die Lösung mit Hilfe eines Vortexschüttlers für 20 s vermischt. Das Öl-Aceton-Gemisch wurde in einem Zeitraum von mindestens 15 min über die Na⁺-SCX SPE-Kartusche gegeben.

Im Anschluss daran erfolgte die Elution von Matrixbestandteilen durch Spülen der Kartusche mit 5 mL Aceton in mindestens 15 min. Im nächsten Schritt wurde das Harz in der Kartusche durch Anlegen eines Unterdrucks an die SPE-Vakuum-Kammer getrocknet. Danach wurde die Säule mit 3 mL Acetonitril:Wasser (84:16, v:v) vorkonditioniert. Die aufgefangenen Extrakt- und Spüllösungen, sowie die Lösung zum Vorkonditionieren der Säulen wurden verworfen. Im nächsten Schritt erfolgte die Elution der Ergotalkaloide mittels 4 mL einer 352 mM NatriumhexansulfonatLösung in Acetonitril:Wasser (84:16, v:v) in mindestens 15 min. Ein Aliquot von 1,5 mL der aufgefangenen Elutionslösung wurde mit Hilfe eines 0,2 µm PTFE-Spritzenvorsatzfilters (A-20/3) in Braunglasvials filtriert und bei -25 °C gelagert. Die instrumentelle Analytik erfolgte mit der in Tabelle 6 angegebenen Methode A.

4.2.3.4 Ermittlung von Validierungsparametern

Für die Probenvorbereitung zur epimerenspezifischen Quantifizierung von Ergotalkaloiden in Roggenmehl und Weizenkeimöl wurden die nachfolgend aufgeführten Validierungsparameter bestimmt.

Linearität

Die Linearität innerhalb des Bereiches zwischen 2-50 µg kg⁻¹ wurde für jeden der zwölf Analyten durch Dreifachmessung einer 10-Punkt-Kalibriergeraden überprüft. Es wurde hierfür eine Ergotalkaloid-MixLösung aller 12 prioritären Ergotalkaloide in 352 mM NatriumhexansulfonatLösung in Acetonitril:Wasser (84:16, v:v) verwendet. Die Datensätze der Kalibriergeraden wurden auf Ausreißer mit Hilfe des Ausreißer-F-Test bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 überprüft. Des Weiteren erfolgte eine Überprüfung der Linearität über den Linearitätstest nach Mandel (Irrtumswahrscheinlichkeit 0,05). Nach erfolgreicher Überprüfung der Datensätze auf Ausreißer und Linearität wurden die Steigung und der Achsenabschnitt der Kalibriergeraden, das Bestimmtheitsmaß (R^2) und die Reststandardabweichung ermittelt.

Arbeitsbereich

Der Arbeitsbereich wurde auf den Bereich zwischen 2-50 µg kg⁻¹ festgelegt. Die Varianzhomogenität wurde zwischen dem oberen und unteren Ende des Arbeitsbereiches für die

Kalibrierpunkte mit einem Gehalt von $2,9 \mu\text{g kg}^{-1}$ und $52,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ nachgewiesen, indem die beiden Kalibrierpunkte zehnfach seriell vermessen wurden. Die betreffenden Datensätze konnten erfolgreich auf Normalverteilung mittels R/s-Test, auf Ausreißer über den Grubbs-Test [85] und auf Trends mit Hilfe des Tests nach Neumann [86] (Irrtumswahrscheinlichkeit für alle Tests: 0,05) überprüft werden. Anschließend wurde die Prüfung der Varianzhomogenität über den F-Test erfolgreich durchgeführt ($n = 10$, Irrtumswahrscheinlichkeit 0,05). Alle statistischen Berechnungen erfolgten mit Hilfe der Software Statist.

Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Bestimmung der NG und BG erfolgte über das Signal/Rausch-Verhältnis. Es wurde das Untergrundrauschen innerhalb der Peakgrenzen des zu untersuchenden Analytsignals (c_{Analyt} nahe der NG) in einer Leerwert-Probe durch Integration des Basislinien-Medians ermittelt.

$$S/N = A_{(\text{Analyt})} / A_{(\text{Untergrundrauschen der Leerwert-Probe})}.$$

Die NG (BG) war der Gehalt, bei dem die Signalfläche dreimal (zehnmal) so groß war wie das Rauschen. Zur besseren Bestimmung der NG und BG wurde eine Kalibriergerade in der Nähe der NG gemessen. Die dreifachen (zehnfachen) Signalflächen des ermittelten Rauschens wurden in diese Kalibriergeraden eingesetzt und dadurch die Gehalte der NG (BG) berechnet. Da die NG bzw. BG für die einzelnen Ergotalkaloide unterschiedlich hoch waren, wurde der Anfangspunkt des Arbeitsbereiches bei dem Massenanteil festgelegt, bei dem der Analyt mit der höchsten BG noch erfasst werden kann.

Wiederfindungsrate

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde eine ergotalkaloidfreie Matrix (unbelastetes Roggenmehl bzw. Rapsöl) mit einer Ergotalkaloidstandardlösung in Acetonitril (Mix-Lösung aus den 6 prioritären Ergotalkaloiden sowie deren korrespondierende (S)-Epimere) dotiert. Es wurden 150 μL dieser Lösung auf die Matrix gegeben. Die Bestimmung der Wiederfindungsrate erfolgte am unteren ($2 \mu\text{g kg}^{-1}$), in der Mitte ($30 \mu\text{g kg}^{-1}$) und am oberen Ende ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$) des Arbeitsbereiches. Die Ergotalkaloidgehalte in der Dotierlösung wurden dabei so gewählt, dass der Gehalt in der nach der Aufarbeitung der Probe erhaltenen Natriumhexansulfonatlösung 2, 30 bzw. $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ pro Ergotalkaloid betrug. Nach mindestens

70 min wurde dann die Probe wie zuvor beschrieben aufgearbeitet. Alle Proben wurden sechsfach aufgearbeitet.

Messpräzision

Zur Bestimmung der Messpräzision wurden sechs Proben an je fünf Tagen aufgearbeitet. Dieses erfolgte im Falle des Roggenmehls anhand eines mit Sklerotienmehl dotierten Mehls. Zur Bestimmung der Messpräzision beim Weizenkeimöl wurde ein Rapsöl verwendet, welches auf einen Ergotalkaloidgehalt von $30 \mu\text{g kg}^{-1}$ dotiert wurde (zur Vorgehensweise der Dotierung siehe Wiederfindungsrate). Die erhaltenen Datensätze wurden auf Normalverteilung mittels R/s-Test, auf Ausreißer über den Grubbs-Test und auf Trends mit Hilfe des Tests nach Neumann (Irrtumswahrscheinlichkeit aller Tests: 0,05) erfolgreich überprüft. Mit dem F-Test nach Bartlett wurde die Homogenität der einzelnen Datensätze geprüft (Irrtumswahrscheinlichkeit 0,05), so dass angenommen werden konnte, dass alle Daten aus der gleichen Grundgesamtheit stammen und demnach zur weiteren Berechnung der Präzision nach DIN ISO 5725 [87] zusammengefasst werden können.

4.2.3.5 Probenvorbereitung nach §64 LFGB-Verfahren

Zu $20,0 \pm 0,1$ g Roggenmehl wurden in ein 240 mL Zentrifugenglas eingewogen und 100 mL des Extraktionslösungsmittels bestehend aus Ethylacetat:Methanol:Ammoniumhydroxid-lösung (25 %ig) (75:5:7, v:v:v) hinzugegeben und für 45 min auf einem Horizontalschüttler bei 300 min^{-1} geschüttelt. Anschließend wurde bei $3000 \times g$ für 10 min bei 10°C zentrifugiert. Danach wurden 5 mL des Überstandes über ein Reservoirgefäß auf eine basische Al_2O_3 Säule gegeben (Durchflussgeschwindigkeit 1 Tropfen s^{-1}). Dann wurde ein Aliquot von 2 mL in ein Vial überführt und im Stickstoffstrom bei 45°C zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde anschließend in dem HPLC-Laufmittel, bestehend aus Acetonitril:Wasser + 200 mg L^{-1} Ammoniumcarbamat (50:50, v:v), aufgenommen und bei Raumtemperatur 15 min im Ultraschallbad gelöst und anschließend mit Hilfe des Vortexschüttlers vermischt. Die Probenlösung wurde im letzten Schritt der Probenvorbereitung durch einen PVDF-Spritzenvorsatzfilter in ein Braunglasvial überführt. Die instrumentelle Analyse der Proben erfolgte unmittelbar im Anschluss an die Probenvorbereitung mit der in Tabelle 6 angegebenen Methode A.

4.2.3.6 Quantifizierung des Ergotalkaloidgehaltes

Die Quantifizierung der Ergotalkaloidgehalte in den unter 5.2 analysierten Proben erfolgte anhand einer externen Kalibrierung. Hierfür wurden aus den Ergotalkaloid-Feststoffen entsprechende Einzelstandard-Stammlösungen hergestellt. Die Feststoffe wurden mit Ausnahme von Ergometrin(in) (ACN : H₂O, 84 : 16, v : v) und Ergotamin(in) (ACN : H₂O, 50 : 50, v : v) in Acetonitril aufgenommen. Aus den so erhaltenen Einzelstandard-Stammlösungen wurde eine Mix-Stammlösung in Acetonitril, welche alle zwölf prioritären Ergotalkaloide (Ergometrin, Ergosin, Ergotamin, Ergocornin, α -Ergocryptin, Ergocristin und die jeweiligen (S)-Epimere) enthielt, hergestellt, indem die Einzelstandardlösungen eingewogen, im Stickstoffstrom zur Trockne eingeeengt und anschließend in der entsprechenden Menge Acetonitril wieder aufgenommen wurden. Der Gehalt jedes Analyten betrug 10 mg kg⁻¹. Ein Aliquot dieser Lösung wurde eingewogen und unter Stickstoff verdampft. Der resultierende Rückstand wurde in Acetonitril:Wasser (84:16, v:v) aufgenommen, so dass eine zweite Stammlösung mit einem Gehalt von 200 µg kg⁻¹ pro Analyt erhalten wurde. Für die Quantifizierung der Ergotalkaloidgehalte in den Abschnitten 5.2.2 bis 5.2.6 wurde aus dieser Lösung eine 10-Punkt-Kalibriergerade erstellt. Dafür wurden entsprechende Mengen der zweiten Stammlösung eingewogen, bei Raumtemperatur im Stickstoffstrom zur Trockne eingeeengt und anschließend mit Hilfe einer Lösung von Acetonitril:Wasser + 352 mM Natriumhexansulfonat (84:16, v:v) wieder aufgenommen. Für die Kalibriergerade wurden Analytgehalte (pro Ergotalkaloid) erstellt: 1,4; 2,8; 5,0; 10,0; 16,6; 23,3; 30,1; 34,5; 40,7 und 49,3 µg kg⁻¹. Es wurden Kalibriergeraden für jede Verbindung erstellt. Die Standardlösungen wurden bei -25 °C gelagert. Die Messung der Proben und der Kalibriergeraden erfolgte mit der in Tabelle 6 angegebenen Methode A. Bei jeder Messsequenz wurde eine Kalibriergerade gemessen. Für die unter 5.2.1 beschriebenen Experimente wurden aus der zweiten Stammlösung mit einem jeweiligen Ergotalkaloidgehalt von 200 µg kg⁻¹ 6-Punkt-Kalibriergeraden durch Verdünnung mit Acetonitril:Wasser (84:16, v:v) erstellt. Die Messung der Proben und der Kalibriergeraden erfolgte mit der Methode E, Tabelle 6.

4.2.4 Epimerisierungs- und Abbauverhalten durch Backen und im *in vitro* Verdaumodell

4.2.4.1 Quantifizierung des Ergotalkaloidgehaltes

Die Ergotalkaloidgehalte der unter 5.3.1 und 5.3.2 analysierten Proben wurden durch eine externe Kalibrierung quantifiziert. Hierfür wurde die unter 4.2.3.6 beschriebene Acetonitril Mix-Stammlösung verwendet, in der alle zwölf prioritären Ergotalkaloide (Ergometrin, Ergosin, Ergotamin, Ergocornin, α -Ergocryptin, Ergocristin und die jeweiligen (*S*)-Epimere) mit einem jeweiligen Gehalt von 10 mg kg^{-1} gelöst waren. Ein Aliquot dieser Lösung wurde eingewogen und im Stickstoffstrom verdampft. Der resultierende Rückstand wurde in Acetonitril:Wasser (84:16, v:v) wieder aufgenommen, so dass eine zweite Stammlösung mit einem Gehalt von $200 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ pro Analyt erhalten wurde. Aus dieser Lösung wurde eine 7-Punkt-Kalibriergerade durch Verdünnung mit demselben Lösungsmittel mit folgenden Gehalten (pro Analyt) erstellt: 1,0; 6,3; 11,6; 17,0; 22,1; 27,4 und $33,3 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$. Es wurden Kalibriergeraden für jede Verbindung erstellt (Tabelle 7). Für jede Messsequenz wurde eine Kalibriergerade gemessen. Die Gehalte von β -Ergocryptin(in) wurden anhand der Kalibriergeraden von α -Ergocryptin(in) quantifiziert, da von β -Ergocryptin(in) für die durchgeführten Experimente kein Standard von der Firma Alfarma erhältlich war. Die Standardlösungen wurden bei $-25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Statistische Analysen wurden mit Hilfe der Software Statist durchgeführt. Die NG bzw. BG wurden bei den Gehalten festgelegt, an der das Analytsignal das Dreifache bzw. Zehnfache des Signal/Rausch-Verhältnisses einer unbelasteten Probe betrug. Die NG lagen zwischen $1,0 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ (Ergocornin) und $2,9 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ (Ergocorninin).

Tabelle 7: Beispielhafte Darstellung von Kalibriergeraden für die Back- und Verdauxperimente.

	Geradengleichung	R ²
Ergometrin	$y=7,599x-0,570$	0,998
Ergometrinin	$y=9,704x-0,837$	0,998
Ergosin	$y=3,198x-0,239$	0,998
Ergosinin	$y=2,688x-0,397$	0,998
Ergotamin	$y=8,016x-0,649$	0,999
Ergotaminin	$y=5,103x-0,326$	0,998
Ergocornin	$y=5,197x-1,253$	0,999
Ergocorninin	$y=3,875x-1,263$	0,995
α -Ergocryptin	$y=4,441x-0,297$	0,999
α -Ergocryptinin	$y=4,449x+0,022$	0,998
Ergocristin	$y=2,278x+0,307$	0,999
Ergocristinin	$y=3,846x-0,303$	0,998

Die chromatographischen Bedingungen wurden der Literatur entnommen [53,88], wobei der Flussgradient modifiziert wurde. Es wurde die Agilent 1200 HPLC mit fluorimetrischer Detektion verwendet. Zur chromatographischen Trennung der Analyten wurde die in der Tabelle 6 angegebene Methode B verwendet. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Experimente im Abschnitt 4.2.4 sechsfach wiederholt.

4.2.4.2 Herstellung und Analyse des Mehls und der Kekse

Zum Herstellen der Kekse wurde Roggenmehl aus einem Berliner Supermarkt verwendet. Das Roggenmehl (1874,9 g) wurde mit gemahlenen Sklerotien (145,4 g, Partikelgröße < 250 μm) vermischt und in einem Überkopfschüttler homogenisiert (17 Stunden, 9 rpm). Zur Analyse des Ergotalkaloidgehaltes im Mehl wurden $5,0 \pm 0,1$ g des dotierten Roggenmehls in 70 mL Zentrifugengläser mit 25 mL Acetonitril:Wasser (84:16, v:v) für eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt (Horizontalschüttler, 300 min^{-1}). Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 20 °C und $538 \times g$ zentrifugiert. Danach wurden 5 mL der Extrakte mit einem 0,2 μm PTFE-Spritzenvorsatzfilter (A-20/25) filtriert und 50-fach mit Acetonitril:Wasser (84:16, v:v) verdünnt. Die erhaltenen Lösungen wurden in Braunglasvials bei -25 °C vor der instrumentellen Analyse gelagert.

Der Keksteig wurde nach dem Rezept von Arribas-Lorenzo *et al.* [89] hergestellt und enthielt die folgenden Zutaten: NaCl (1 g), NaHCO₃ (1,2 g), Zucker (35 g), Wasser (25 g), Rapsöl

(24 g) und das oben beschriebene sklerotienhaltige Roggenmehl (85 g). Alle Zutaten wurden in ein Becherglas gegeben und unter Rühren für 5 min mit einem Spatel miteinander vermischt. Daraus wurden Kekse mit einem Gewicht von $13,08 \pm 0,02$ g und einem Durchmesser von etwa 5 cm und einer Höhe von ca. 1 cm geformt. Es wurden zwei Teige hergestellt, woraus jeweils drei Kekse für jede Backtemperatur geformt wurden. Die Kekse wurden in einem vorgeheizten Laborofen bei 190 °C für 9, 13 und 17 min gebacken. Nach dem Backen wurden die Kekse bei Raumtemperatur für zwei Stunden abgekühlt und anschließend mit Mörser und Stößel gemahlen. Zur Analyse wurde jeweils 1 g gemahlener Keks analog zu der oben beschriebenen Vorgehensweise extrahiert. Die gefilterten Extrakte wurden 25-fach mit Acetonitril:Wasser (84:16, v:v) verdünnt. Die erhaltenen Lösungen wurden in Braunglasvials bei -25 °C vor der instrumentellen Analyse gelagert.

4.2.4.3 Herstellung und Analyse des Mehls und der Brote

Die Arbeiten zur Herstellung der mit Sklerotien dotierten Mehlproben sowie das Backen, Mahlen und Trocknen der Brote wurde am Max Rubner-Institut (MRI) in Detmold durchgeführt. Für den Teig der Brote wurde ein mit Sklerotienmehl dotiertes Roggenvollkornmehl verwendet. Hierfür wurden 1800 g Roggenvollkornmehl mit 200 g Sklerotienmehl vermischt. Aus dem mit Sklerotien dotierten Mehl wurden drei Brote gebacken. Für jedes der Brote wurden 600 g des dotierten Mehls, 480 g Sauerteig, 6 g Backhefe und 9 g Salz verwendet. Die Backbedingungen waren prinzipiell identisch zu den Bedingungen von industriell gebackenem Brot. Die Bedingungen sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Bedingungen des Brotbackprozesses.

Prozessparameter	Bedingungen	Verwendete Geräte
Kneten	1 min langsam/5 min schnell	Spiralkneter (DIOSNA, Typ SP 8)
Teigtemperatur	29 °C	
Teigruhezeit	15 min	
Teig pro Brot	1,06 kg	
Formen des Brotes	Manuell	
Stückgärzeit	50 min	Gärschrank (MANZ, Typ G 86 W)
Backzeit	60 min	Backmeister (DAUB, Typ BTO 21613-S)
Backtemperatur	210 °C	

Aufgrund der begrenzten Probenmenge wurden zur Analyse der Ergotalkaloidgehalte 2,5 g Mehl oder Brot mit 12,5 mL Acetonitril:Wasser (84:16, v:v) vermischt. Die weitere Aufarbei-

tung der Proben erfolgte analog zur unter 4.2.4.2 beschriebenen Aufarbeitung der Kekse. Alle durchgeführten Analysen der in diesem Abschnitt beschriebenen Mehl- und Brotproben wurden dreifach wiederholt.

4.2.4.4 Durchführung der *in vitro* Verdauxperimente

Die Durchführung der *in vitro* Verdauxperimente erfolgte in Anlehnung an das von Oomen *et al.* [90] vorgestellte Modell. Die Zusammensetzung der verwendeten Verdaulösungen sind an die DIN 19738 [91] angelehnt und in Tabelle 9 dargestellt. Die Verdausimulation erfolgte für den Speichel, Magen und Dünndarm. Bei allen Verdauxperimenten wurden die Lösungen mittels eines Magnetrührers bei 350 rpm gerührt und auf eine Temperatur von 37 °C thermostatiert. Lösungen der einzelnen Verdauungsschritte (Speichel, Magen, Darm) wurden bei 4 °C gelagert und enthielten die anorganischen Komponenten, sowie Harnsäure und Harnstoff. Mucin, α -Amylase, Pepsin, Galle, Pankreatin und Trypsin wurden direkt vor jedem Experiment eingewogen und zu den jeweiligen Lösungen hinzugegeben. Soweit nicht anders angegeben, wurden alle nachfolgend beschriebenen Experimente sechsmal durchgeführt.

Tabelle 9: Zusammensetzung der verwendeten Verdaulösungen.

Anorganische Komponenten		Organische Komponenten	
Speichel (3 mL)			
NaCl	5,0 mg	α -Amylase	2,5 mg
NaSCN	1,5 mg	Harnsäure	0,1 mg
Na ₂ SO ₄	5,5 mg	Harnstoff	1,0 mg
NaHCO ₃	1,5 mg	Mucin	7,5 mg
KCl	4,5 mg		
KH ₂ PO ₄	6,0 mg		
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,5 mg		
Magensaft (7 mL)			
NaCl	29,0 mg	Mucin	30,0 mg
KCl	7,0 mg	Pepsin	10,0 mg
KH ₂ PO ₄	2,7 mg		
Darmsaft (10 mL)			
KCl	3,0 mg	Galle	90,0 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	5,0 mg	Harnstoff	3,0 mg
MgCl ₂ ·6H ₂ O	2,0 mg	Pankreatin	90,0 mg
NaHCO ₃	10,0 mg	Trypsin	3,0 mg

Für die Durchführung der *in vitro* Verdauexperimente wurde $1,0 \pm 0,1$ g gemahlener Keks in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen eingewogen, 3 mL Speichellösung hinzugegeben und für 5 min gerührt. Anschließend wurden 7 mL Magenlösung hinzugefügt, wobei der pH-Wert der resultierenden Lösung mit Hilfe von Salzsäure auf $\text{pH } 2,0 \pm 0,2$ eingestellt wurde. Der pH-Wert wurde mit einem pH-Meter, welches vor jedem Verdauvorgang kalibriert wurde, kontrolliert. Nach zweistündigem Rühren wurde der pH-Wert mittels Natriumhydrogencarbonat auf $7,5 \pm 0,2$ eingestellt. Nun wurden 10 mL der Darmlösung hinzugegeben und die erhaltene Lösung für weitere 2 Stunden gerührt. Danach wurde die Verdaulösung zur Extraktion mit 105 mL Acetonitril vermischt und für eine Stunde auf einem Horizontalschüttler bei 300 min^{-1} geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung bei $2605 \times g$ bei 20°C zentrifugiert und 1,5 mL mittels eines $0,2 \mu\text{m}$ PTFE-Spritzenvorsatzfilters (A-20/3) in Braunglasvials filtriert. Die Lösungen wurden bis zur Analyse bei -25°C gelagert. Die Durchführung des *in vitro* Verdaus ist in Abbildung 25 schematisch dargestellt.

Zur Überprüfung der benötigten Verdauzeit in der Darmlösung wurden die Kekse mit einer Backzeit von 9 min unter Variation der Verdauzeit im Darmtrakt (2 Stunden [90] und 6 Stunden [91]) nach dem zuvor beschriebenen Protokoll verdaut. Die gemittelten Ergebnisse wurden mit Hilfe des Zwei-Stichproben-t-Tests bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 miteinander verglichen. Der Test zeigte, dass die Mittelwerte jedes einzelnen Ergotalkaloidgehaltes beider Verdauzeiten miteinander vergleichbar sind.

Für alle nachfolgend beschriebenen Experimente wurden die Kekse mit einer Backzeit von 13 min verwendet. Zur Bestimmung des Epimerisierungs- und Abbauverhaltens in der Speichellösung wurden zu 1 g gemahlenem Keks 3 mL Speichellösung hinzugegeben und die Mischung für 5 min gerührt. Anschließend erfolgte die Extraktion durch Zugabe von 16 mL Acetonitril. Die Lösung wurde dann geschüttelt, zentrifugiert, filtriert und wie oben beschrieben gelagert. Zur Untersuchung der Epimerisierung der Ergotalkaloide in Speichel und Magen wurde das Verdauexperiment so durchgeführt, wie für den kompletten Verdau bereits beschrieben. Das Experiment wurde nach 2 Stunden Inkubation in der Magenlösung durch Zugabe von 53 mL Acetonitril gestoppt. Alle weiteren Schritte wurden wie in Abbildung 25 beschrieben durchgeführt.

Zur Untersuchung der Effekte der einzelnen Darmenzyme auf die Epimerisierung der Ergotalkaloide wurden 0,5 g gemahlener Keks und 5 mL der Darmlösung verwendet. Die Menge der verwendeten Keksmatrix wurde reduziert, da nur noch geringe Mengen davon vorhanden waren. Die Darmlösung enthielt alle anorganischen Komponenten und Harnstoff. Es wurden vier verschiedene Verdauexperimente mit unterschiedlicher Zusammensetzung der Darmlösung durchgeführt, wobei einmal ein Gemisch unter Zugabe von Galle, Trypsin und Pankreatin verwendet wurde und in drei weiteren Experimenten nur Galle, nur Trypsin und nur Pankreatin der Darmlösung zugesetzt wurden. Der pH-Wert wurde auf $7,5 \pm 0,2$ mit Hilfe von Natriumhydrogencarbonat eingestellt und die Lösung für zwei Stunden gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 26 mL Acetonitril gestoppt. Die Extraktion erfolgte analog dem in Abbildung 25 dargestellten Schema. Für den Verdau der Ergotalkaloid Standardsubstanzen ohne Matrix wurden 60 μL einer Acetonitril-Stammlösung mit einem Gehalt von 10 mg kg^{-1} pro Analyt in 3 mL der Speichellösung gegeben und anschließend gemäß dem in Abbildung 25 dargestellten *in vitro* Verdaumodell verdaut und extrahiert. Dieses Experiment wurde dreifach wiederholt.

Zur Untersuchung des Epimerisierungs- und Abbauverhaltens einer zweiten Matrix wurden die vom MRI gebackenen Brote im *in vitro* Modell verdaut. Zum Ausgleich möglicher Matrixinhomogenitäten wurden 3 g von jedem der Brote verwendet ($n = 3$). Diese wurden in 7,5 mL Speichellösung für 5 min inkubiert. Danach wurden 17,5 mL der Magenlösung hinzugegeben, der pH-Wert mit Salzsäure auf $2,0 \pm 0,2$ eingestellt und 2 Stunden gerührt. Anschließend wurde der pH-Wert durch Zugabe von Natriumhydrogencarbonat auf $7,5 \pm 0,2$ eingestellt und nach Zugabe von 25 mL Darmlösung für 2 Stunden gerührt. Nun wurden zur Extraktion 263 mL Acetonitril hinzugegeben und wie in Abbildung 25 dargestellt geschüttelt, zentrifugiert, filtriert und gelagert.

Tabelle 10: Übersicht des Abbaus und der Veränderung vom Anteil des (*R*)-Epimers am jeweiligen Gesamtergotalkaloidgehalt der durchgeführten Back- und Verdauexperimente.

	Abbau, Standardabweichung in Klammern [%]														
	Backen				Verdau										
	Keks, Backzeit in min			Brot	Keks, Backzeit in min			Standards	Brot	Keks, Backzeit 13 min					
	9	13	17		9	13	17			Speichel	Speichel + Magen	nur Darm alle Enzyme	Galle	Trypsin	Pankreatin
Ergometrin(in)	10,8 (2,5)	12,2 (2,4)	19,5 (2,2)	6,3 (2,2)	8,2 (2,4)	6,7 (1,9)	7,3 (2,1)	-0,5 (0,9)	0,0 (1,7)	0,0 (2,0)	7,7 (1,7)	7,8 (2,9)	8,6 (2,2)	9,3 (1,8)	9,6 (2,8)
Ergosin(in)	11,5 (1,5)	17,6 (1,1)	24,3 (0,8)	25,2 (6,3)	9,1 (2,9)	8,9 (2,2)	12,4 (3,5)	-0,7 (0,4)	0,4 (7,2)	0,4 (2,5)	3,3 (3,1)	10,1 (2,2)	11,4 (1,9)	12,6 (3,3)	13,4 (2,9)
Ergotamin(in)	10,5 (2,2)	20,2 (2,1)	30,2 (2,1)	5,9 (4,8)	9,6 (2,4)	9,0 (2,6)	9,4 (2,8)	0,0 (0,0)	1,8 (3,4)	0,3 (2,5)	5,6 (2,4)	6,9 (2,5)	7,3 (2,9)	8,2 (2,4)	9,8 (2,2)
Ergocornin(in)	1,9 (3,3)	3,4 (3,2)	8,4 (3,3)	22,7 (7,2)	10,9 (6,4)	10,2 (2,4)	18,2 (5,7)	0,9 (0,4)	-1,0 (4,0)	0,3 (2,5)	6,9 (3,5)	12,7 (2,8)	13,9 (4,2)	12,1 (3,5)	15,7 (3,9)
α -Ergocryptin(in)	7,7 (2,0)	10,9 (1,8)	14,3 (1,8)	1,8 (4,6)	6,4 (3,1)	2,9 (5,1)	16,0 (5,5)	-0,2 (0,3)	3,5 (5,5)	1,7 (2,8)	2,3 (3,5)	3,6 (3,7)	2,6 (4,0)	1,3 (4,8)	2,5 (5,0)
β -Ergocryptin(in)	6,0 (1,9)	10,7 (1,7)	15,2 (1,8)	13,3 (3,9)	12,7 (2,9)	8,6 (4,8)	19,7 (5,1)	---	7,0 (4,7)	1,2 (4,0)	6,0 (4,2)	10,9 (2,8)	14,5 (3,1)	14,9 (3,0)	14,8 (3,1)
Ergocristin(in)	8,5 (1,3)	13,2 (1,3)	18,8 (1,0)	16,0 (7,8)	11,0 (3,8)	7,6 (3,7)	15,6 (3,7)	1,4 (2,8)	2,2 (4,3)	0,9 (2,2)	4,4 (2,5)	1,6 (4,4)	2,4 (3,1)	2,5 (2,9)	4,9 (3,5)

	Epimerisierung - Änderung des Verhältnisses von (<i>R</i>)-Epimer/(<i>R</i>)+(<i>S</i>)-Epimer, Standardabweichung in Klammern [%]														
	Backen				Verdau										
	Keks, Backzeit in min			Brot	Keks, Backzeit in min			Standards	Brot	Keks, Backzeit 13 min					
										Speichel	Speichel + Magen	nur Darm			Galle
	9	13	17		9	13	17					alle Enzyme			
Ergometrin(in)	-35,4 (3,2)	-40,4 (3,0)	-45,2 (2,7)	-23,7 (2,7)	2,7 (2,4)	3,9 (1,9)	5,6 (1,8)	1,3 (0,3)	-0,6 (1,7)	2,0 (1,9)	5,7 (1,7)	7,5 (3,3)	9,0 (2,3)	8,5 (1,8)	6,5 (2,6)
Ergosin(in)	-35,7 (1,3)	-39,3 (1,0)	-40,8 (0,7)	-9,1 (6,2)	15,7 (2,6)	19,5 (2,2)	22,8 (3,9)	16,5 (0,3)	5,2 (7,5)	-1,6 (1,7)	-0,6 (2,0)	20,4 (2,2)	20,2 (1,8)	11,3 (2,5)	19,9 (3,1)
Ergotamin(in)	-37,9 (2,6)	-41,3 (2,4)	-42,9 (2,4)	-2,5 (5,5)	15,2 (2,2)	19,0 (2,5)	21,1 (2,2)	13,7 (0,5)	2,1 (3,7)	-1,3 (1,9)	1,9 (2,2)	17,1 (2,2)	16,5 (2,5)	9,0 (2,0)	16,7 (2,0)
Ergocornin(in)	-16,7 (3,4)	-22,7 (3,4)	-26,5 (3,4)	-11,4 (6,0)	-14,7 (1,9)	-7,7 (1,3)	-5,6 (2,5)	-9,0 (0,6)	-15,6 (3,0)	-0,4 (2,2)	-5,9 (2,2)	-3,2 (1,3)	-4,1 (1,9)	-4,4 (1,7)	-3,9 (2,0)
α-Ergocryptin(in)	-12,8 (1,9)	-18,9 (1,7)	-23,6 (1,7)	-11,8 (4,5)	-22,2 (2,5)	-15,1 (3,1)	-12,8 (3,0)	-1,0 (0,7)	-11,3 (4,7)	-1,2 (1,5)	-6,1 (3,6)	-8,6 (2,3)	-8,8 (2,4)	-8,0 (2,1)	-8,8 (2,7)
β-Ergocryptin(in)	-10,8 (1,7)	-16,2 (1,6)	-20,6 (1,6)	-11,4 (4,0)	-20,8 (2,3)	-16,3 (2,6)	-12,4 (2,8)	---	-12,0 (3,5)	-3,9 (2,8)	-5,1 (3,0)	-9,0 (1,8)	-8,0 (3,0)	-8,6 (2,1)	-9,9 (2,5)
Ergocristin(in)	-16,6 (1,3)	-24,8 (1,2)	-30,2 (0,9)	-8,2 (8,6)	-22,5 (2,5)	-14,8 (1,7)	-10,2 (2,4)	-3,1 (2,1)	-10,9 (3,8)	-2,4 (1,6)	-1,8 (1,5)	-6,7 (2,1)	-6,3 (2,1)	-6,2 (2,1)	-7,0 (1,7)

4.2.5 Ergotalkaloid-Konjugate, die unter Lichteinfluss entstehen

4.2.5.1 Lumi-Ergometrin

Synthese

Die Synthese von LEM erfolgte in Anlehnung an Stoll und Schlientz [30]. Es wurden 22,1 mg (50 μ mol) Ergometrin-Maleat in 2,2 mL 10 %iger Essigsäure in einem 10 mL Glaskolben gelöst. Diese Lösung wurde für 8,5 Stunden unter UV-Licht ($\lambda = 350$ nm, Spektrum Abbildung 8) bei Raumtemperatur bestrahlt. Im Anschluss daran wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene braune Pulver wurde in 2 mL Acetonitril:Wasser (20:80, v:v) aufgenommen. Die Hauptfraktion des unpolareren LEM wurde mittels HPLC-DAD aufgereinigt. Hierfür wurde die in Tabelle 6 beschriebene Methode J verwendet. Es wurden 12,1 mg von 10-(S)-LEM erhalten, was einer Ausbeute von 52 % entspricht. Die erhaltene Substanz wurde in 1,02 mL Methanol:Wasser (100:2, v:v) aufgenommen. Es wurden farblose Kristalle nach Verdunstung des Lösungsmittels bei Raumtemperatur in Dunkelheit erhalten. Die Messungen der Kristalle mittels Röntgen-Einkristallstrukturanalyse und die Datenauswertung wurden wie unter 4.3.1 angegeben durchgeführt.

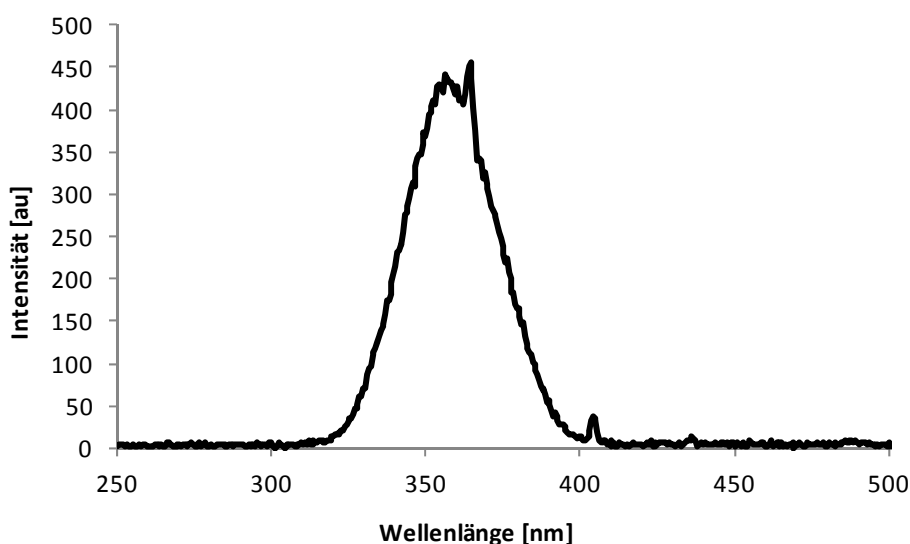


Abbildung 8: Spektrum der UV-Lampe (Universal UV-Lampe TL-900)

Extraktion von LEM aus Sklerotien

Zum Nachweis von LEM in Matrixproben wurden dunkel gelagerte Sklerotien aus den Jahren 2009 ($n = 1$) und 2008 ($n = 5$), geerntet auf verschiedenen Feldern in Deutschland und eine mindestens 20 Jahre alte Probe, welche unter Tageslicht gelagert wurde, analysiert. Zu den ungemahlenen Sklerotien (4 - 7 Stück mit einem jeweiligen Gesamtgewicht von 484 - 665 mg) wurden 1,5 mL Acetonitril:Wasser (84:16, v:v) hinzugegeben und durch Schüttelextraktion in braunen 2 mL Eppendorf-Gefäßen mit einem Horizontalschüttler bei 300 min^{-1} für eine Stunde geschüttelt. Die Extrakte wurden für 10 min bei $14000 \times g$ zentrifugiert. Anschließend wurden die Extrakte über einen $0,2 \mu\text{m}$ PTFE-Spritzenvorsatzfilter (A-20/3) in Braunglasvials überführt. Die instrumentelle Analytik erfolgte mit der in Tabelle 6 dargestellten HPLC-ESI-MS/MS-Methode D.

Wassergehalt in Sklerotien und Roggenmehl

Der Wassergehalt in Sklerotien (Probe aus der Ernte 2009) und in Roggenmehl (gekauft in einem lokalen Berliner Supermarkt) wurde über eine Karl-Fischer-Titration bestimmt. Es wurden 100 mg gemahlene Sklerotien bzw. 50 mg Roggenmehl verwendet ($n = 3$). Der Wassergehalt betrug $4,54 \pm 0,05 \%$ in Sklerotien und $11,63 \pm 0,03 \%$ im Roggenmehl.

4.2.5.2 Ergotalkaloid-Fettsäure-Konjugate

Synthese

Die Synthese der Ergotalkaloid-Fettsäure-Konjugate erfolgte in Anlehnung an die unter 4.2.5.1 beschriebene Synthese von LEM. Es wurden die in Tabelle 11 dargestellten Mengen an Ergotalkaloid, Fettsäure und Acetonitril für 3,5 Stunden unter UV-Licht ($\lambda = 350 \text{ nm}$) bestrahlt.

Tabelle 11: Darstellung der eingesetzten Substanzmengen zur Synthese der Ergotalkaloid-Fettsäure-Konjugate.

Ergotalkaloid [mg]	Fettsäure [g]		Acetonitril [g]		Ergotalkaloid-Fettsäure-Konjugat [mg]	HPLC-Methode (Tabelle 6)	t _R [min]
Ergocornin	3,3	Linolsäure	1,2345	26,6425	1,8	G	8,3
α-Ergocryptin	3,2	Linolsäure	1,3209	26,7449	1,4	H	7,3
Ergotamin-Tartrat	15,4	Linolsäure	6,5110	36,0262	4,2	G	7,0
Ergocornin	1,5	Ricinolsäure	0,0496	0,7656	k.A.	F	6,0
α-Ergocryptin	1,6	Ricinolsäure	0,0525	0,7683	k.A.	F	6,7
Ergotamin-Tartrat	11,6	Ricinolsäure	0,3027	6,1509	1,2	F	5,5

k.A. ...keine Angabe möglich, da erhaltenen Mengen zu gering waren

Zur Aufreinigung der Ergotalkaloid-Fettsäure-Konjugate wurden die bestrahlten Lösungen chromatographisch aufgetrennt. Es wurden die in Tabelle 11 dargestellten Methoden verwendet.

Zur Charakterisierung der synthetisierten Standards wurden die exakten Massen mit Hilfe einer Thermo Scientific Exactive Orbitrap im positiven ESI-Modus gemessen. Es wurden die in Acetonitril gelösten, synthetisierten Ergotalkaloid-Fettsäure-Konjugate über eine Spritzenpumpe mit einer Flussrate von 5 µL min⁻¹ injiziert. Die Akkumulationsrate betrug 50 Scans. Die Massenauflösung betrug $R = 100000$ (Modus: ultra high). Die Datenauswertung erfolgte mit der Thermo Xcalibur™ software 2.2.

Extraktion der Ergotalkaloid-Fettsäure-Konjugate aus Sklerotien

Es wurde dunkel gelagertes Sklerotienmehl (Partikelgröße < 500 µm) für 0, 1, 2, 3, 4 und 5 Stunden unter UV-Licht ($\lambda = 350$ nm, Spektrum Abbildung 8) bestrahlt. Zur Extraktion wurden anschließend in einem braunen 2 mL Eppendorf-Gefäß je dreimal zu 200 mg Sklerotienmehl 380 µL Acetonitril hinzugegeben und mit einem Horizontalschüttler für 60 min bei 300 min⁻¹ geschüttelt. Danach wurden die Lösungen 10 min bei $14000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und über einen 0,2 µm PTFE-Spritzenvorsatzfilter (A-20/3) in Braunglasvials überführt. Die Analyse der Extrakte erfolgte mit Hilfe der in Tabelle 6 angegebenen HPLC-ESI-MS/MS-Methode C.

Für jeden der sechs Analyten wurden die substanzspezifischen MS/MS-Parameter über Spritzenpumpeninfusion optimiert und je drei Massenübergänge gemessen. Die Parameter sind in Tabelle 33 angegeben. Die dwell time betrug 50 ms. Die massenspektrometrischen Messungen erfolgten in zwei Zeitfenstern im MRM-Modus. Im ersten Zeitfenster (3,0 - 6,5 min) erfolgte die Messung der drei Ergotalkaloid-Ricinolsäure-Konjugate, im zweiten Zeitfenster (6,5-25 min) die der Ergotalkaloid-Linolsäure-Konjugate.

4.3 Einkristallstrukturanalytik

4.3.1 Messung der Kristallstrukturen

Die Messungen der Verbindungen LEM, Ergotaminin und Lysergolmonohydrat wurden bei 296 K unter Verwendung von monochromatischer Mo K α -Strahlung ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) an einem APEX II Diffraktometer, ausgestattet mit einem CCD-Flächendetektor, ausgeführt. Die Datenreduktion erfolgte mit Hilfe der Programme SAINT und SADABS [92]. Die Struktur wurde mittels Direkter Methoden gelöst und unter Verwendung der Methode der kleinsten Fehlerquadrate mittels SHELX verfeinert [93]. Anisotrope Auslenkungsparameter wurden für die Nicht-Wasserstoffatome verfeinert. Die Wasserstoffatome wurden isotrop behandelt, mit $U_{\text{iso}} = 1,2 \times U_{\text{eq}}$ der Vorgängeratome. Für die Wasserstoffatome der Methylgruppen und der Sauerstoffatome wurde $U_{\text{iso}} = 1,5 \times U_{\text{eq}}$ der Vorgängeratome gewählt.

Die Messungen der Verbindung Ergometrinin wurden bei 298 K unter Verwendung von monochromatischer Cu K α -Strahlung ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$) an einem Enraf-Nonius CAD-4 Diffraktometer durchgeführt. Die Datenreduktion erfolgte mit Hilfe der CAD-4 Software [94] und CORNIC Packages [95]. Die Struktur wurde mittels Direkter Methoden gelöst unter Verwendung des Programms SIR [96] und mit Hilfe von SHELX verfeinert [93]. Anisotrope Auslenkungsparameter wurden für die Nicht-Wasserstoffatome verfeinert. Die Wasserstoffatome wurden isotrop behandelt, mit $U_{\text{iso}} = 1,2 \times U_{\text{eq}}$ der Vorgängeratome. Für Wasserstoffatome der Methylgruppen und der Sauerstoffatome wurde $U_{\text{iso}} = 1,5 \times U_{\text{eq}}$ der Vorgängeratome gewählt.

4.3.2 Ergometrinin

Zur Umwandlung von Ergometrin-Maleat in das C8-(S)-konfigurierte Epimer Ergometrinin wurden 40 mg Ergometrin-Maleat in 104 mL Methanol:28%ige Ammoniumhydroxidlösung (100:4, v:v) in einem 250 mL Rundkolben gelöst. Die Lösung wurde bei 40 °C unter Dunkel-

heit in einem Trockenschrank gelagert. Nach vier Tagen wurde die Lösung unter verminder-tem Druck bis zur Trockne eingeeengt und anschließend in Wasser:Acetonitril (70:30, v:v) wieder aufgenommen. Ergometrinin wurde aus dem Epimerengemisch mit Hilfe einer HPLC aufgereinigt (Tabelle 6, Methode I). Das erhaltene farblose Pulver wurde in Acetonitril:Wasser (80:20, v:v) gelöst. Durch Verdampfen des Lösungsmittels bei Raumtemperatur in Dunkelheit wurden farblose Kristalle erhalten [97].

4.3.3 Ergotaminin

12,4 mg Ergotamin-Tartrat wurden in 5,5 mL Methanol:Wasser (50:5, v:v) gelöst. Zur Umwandlung von Ergotamin-Tartrat in das C8-(S)-konfigurierte Epimer Ergotaminin wurde die Lösung in einem verschlossenen Vial bei Raumtemperatur unter Dunkelheit für zwei Wochen gelagert. Bedingt durch die deutlich schlechtere Löslichkeit von Ergotaminin [98] wurden durch die langsame Kristallisation farblose Kristalle erhalten. Die Isomerenreinheit (98 %) des erhaltenen Ergotaminins wurde durch die HPLC-FLD (Methode E, Tabelle 6) überprüft [99].

4.3.4 Lysergolmonohydrat

Es wurden 1,4 mg epimerenreines Lysergol (Epimerenreinheit > 97 %, HPLC-FLD Methode E, Tabelle 6) in 1,2 mL Acetonitril:Wasser (84:16, v:v) in einem Glasvial gelöst. Das Gefäß wurde verschlossen und unter Ausschluss von Licht bei Raumtemperatur gelagert. Dabei bildeten sich innerhalb von zwei Tagen farblose Kristalle. Um eine Umwandlung von Lysergol in iso-Lysergol auszuschließen, wurde die Epimerenreinheit der erhaltenen Kristalle ebenfalls mit Hilfe der HPLC-FLD (Methode E, Tabelle 6) überprüft [100].

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Untersuchungen zum Epimerisierungsverhalten von Ergotalkaloiden

Zur Erlangung eines besseren Verständnisses zum Epimerisierungsverhalten von Ergotalkaloiden wurden, auch in Vorbereitung zur Entwicklung des unter 5.2 beschriebenen neuen Analysenverfahrens, die nachfolgend beschriebenen Experimente und Berechnungen durchgeführt.

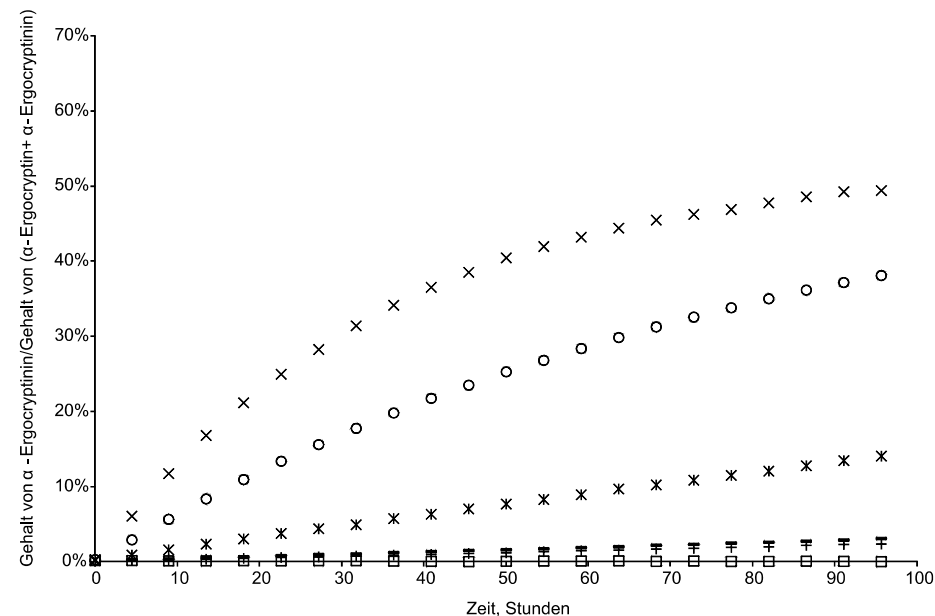
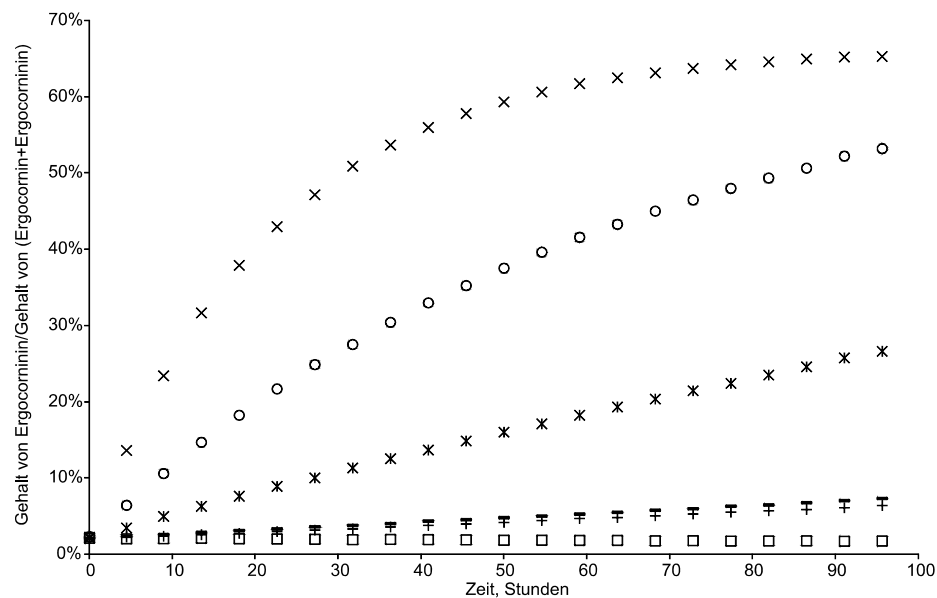
5.1.1 Untersuchung des Epimerisierungsverhaltens in verschiedenen Lösungsmittelgemischen

Zur Untersuchung der Epimerisierungsrate und der Lage des Epimerengleichgewichtes wurden reine (*R*)-Epimere der Ergotalkaloide Ergocornin und α -Ergocryptin in verschiedene Lösungsmittelgemische gegeben, die auch in der Ergotalkaloidanalytik verwendet werden (Tabelle 12). Die Gründe für die Auswahl der Lösungsmittelgemische sind im Abschnitt 5.2.1.1 beschrieben.

Tabelle 12: Auswahl an Lösungsmittelgemischen, welche in der Literatur für die epimerenspezifische Ergotalkaloidanalytik verwendet werden.

Lösungsmittelgemische	Quelle
Acetonitril:Wasser + 200 mg L ⁻¹ Ammoniumcarbonat (84:16, v:v)	Krska <i>et al.</i> (2008) [75] Crews <i>et al.</i> (2009) [58] Kokkonen <i>et al.</i> (2010) [76]
Acetonitril:Wasser + 200 mg L ⁻¹ Ammoniumcarbammat (50:50, v:v)	Müller <i>et al.</i> (2006) [88] Müller <i>et al.</i> (2009) [53] Franzmann <i>et al.</i> (2010) [101]
Acetonitril:Wasser + 10 mM Ammoniumcarbammat (1:4, v:v)	Storm <i>et al.</i> (2007) [78]
Methanol + 10 mM Ammoniumformiat (50:50, v:v)	Bürk <i>et al.</i> (2006) [60]

Es wurden exemplarisch die Ergotalkaloide Ergocornin und α -Ergocryptin verwendet, da diese in einem Roggenmehlextrakt neben Ergocristin die deutlichste Verschiebung des Epimerenverhältnisses nach sechs Tagen zeigten [29].



+ Acetonitril:Wasser (84:16, v:v) — Acetonitril:Wasser + 200 mg L⁻¹ Ammoniumcarbonat (84:16, v:v) □ Acetonitril:Wasser + 352 mM Natriumhexansulfonat (84:16, v:v)
 × Acetonitril:Wasser + 200 mg L⁻¹ Ammoniumcarbamat (50:50, v:v) × Acetonitril:Wasser + 10 mM Ammoniumcarbamat (20:80, v:v) ○ Methanol + 10 mM Ammoniumformiat (50:50, v:v)

Abbildung 9: Prozentualer Anteil von Ergocorninin am Gesamt-Ergocornin(in)-Gehalt bzw. α-Ergocryptinin am Gesamt-α-Ergocryptin(in)-Gehalt in verschiedenen Lösungsmittelgemischen (Tabelle 12) über 96 Stunden.

In Abbildung 9 ist zu erkennen, dass bis auf das Lösungsmittelgemisch Acetonitril:Wasser + 352 mM Natriumhexansulfonat in allen Lösungsmittelgemischen eine Epimerisierung stattfindet. Eine mögliche Erklärung für die Inhibierung der Epimerisierung durch Zugabe des Tensids Natriumhexansulfonat kann die Bildung eines Ionenpaars sein (Abbildung 10).

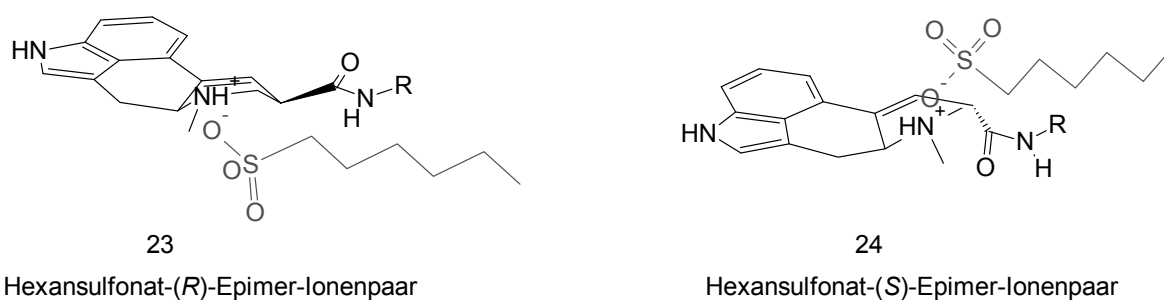


Abbildung 10: Mögliche Koordination des Hexansulfonates an der N6-Position von Ergotalkaloiden

Das Hexansulfonat könnte an der N6-Position des Ergotalkaloids über ionische Wechselwirkungen gebunden sein und durch seinen sterischen Anspruch eine Epimerisierung verhindern.

5.1.2 Kinetische Berechnungen zum Epimerisierungsverhalten von Ergotalkaloiden in verschiedenen Lösungsmittelgemischen

Ausgehend von den experimentellen Daten zur Epimerisierung von Ergocornin und α -Ergocryptin (Abbildung 9) in verschiedenen Lösungsmittelgemischen wurden kinetische Berechnungen zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktion durchgeführt. Bei der Epimerisierungsreaktion handelt es sich um eine Gleichgewichtsreaktion, so dass für die Geschwindigkeiten der Teilreaktionen $A \rightarrow B$ und $B \rightarrow A$ (A : (R)-Epimer, B : (S)-Epimer) die folgenden Gleichungen für die Reaktionsgeschwindigkeit v aufgestellt werden können:

$$v = k[A] \text{ (Gl. 1) und } v = k'[B] \text{ (Gl. 2).}$$

Für die Gesamtänderung der Konzentration von A gilt dann:

$$\frac{dA}{dt} = -k[A] + k'[B] \quad (\text{Gl. 3}).$$

Wenn zu Beginn der Reaktion $[A] = [A_0]$ ist und kein B in der Mischung vorliegt, so gilt zu allen Zeitpunkten t: $[A] + [B] = [A_0]$ (Gl. 4). Durch Einsetzen der Beziehung aus Gleichung 4 in die Gleichung 3 ergibt sich:

$$\frac{dA}{dt} = -k[A] + k'([A_0] - [A]) = -(k + k')[A] + k'[A_0] \quad (\text{Gl. 5}).$$

Daraus erhält man durch Integration:

$$[A] = \frac{k' + ke^{-(k+k')t}}{k + k'} [A_0] \quad (\text{Gl. 6}).$$

Durch nichtlineare Kurvenanpassung mit Hilfe der Gleichung 6 lassen sich iterativ die Geschwindigkeitskonstanten k und k' bestimmen (Abbildung 11). Die Geschwindigkeitskonstanten wurden für die Epimerisierung von α -Ergocryptin und Ergocornin in drei verschiedenen Lösungsmittelgemischen [60,78,88] bestimmt (Tabelle 13).

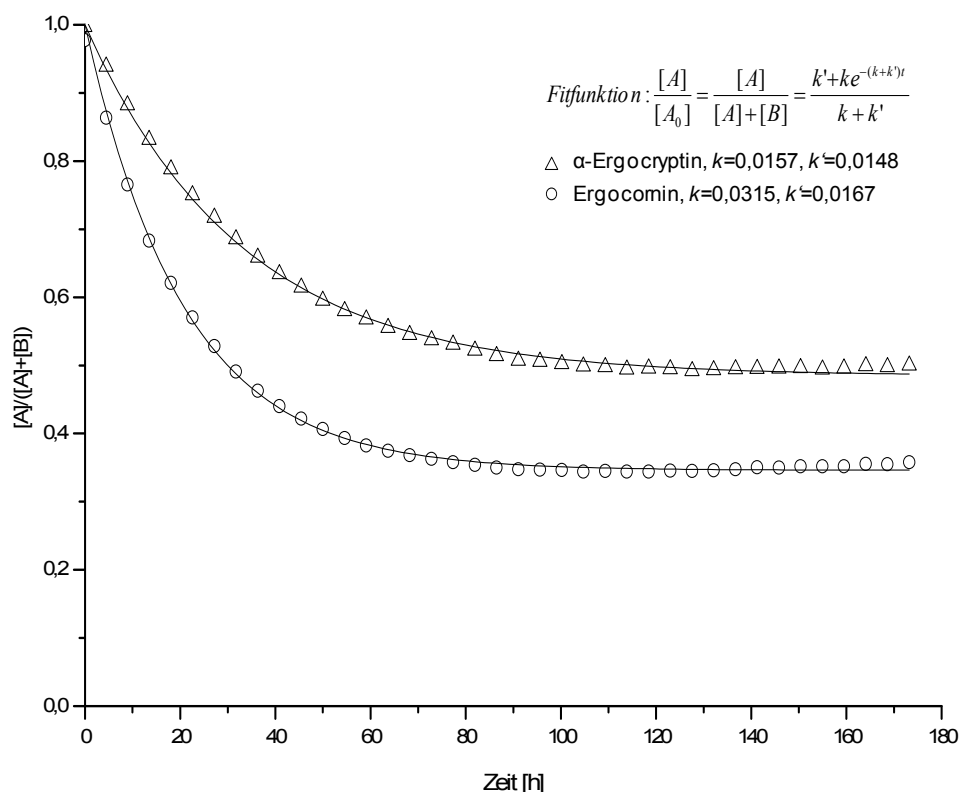


Abbildung 11: Zeitliche Veränderung des prozentualen Gehalts des eingesetzten Epimers im Verhältnis zum Gesamttergotalkaloidgehalt in Acetonitril:Wasser + 10 mM Ammoniumcarbammat (1:4, v:v) [78].

In Abbildung 11 ist dargestellt, dass das Gleichgewicht zwischen den Epimeren von α -Ergocryptin und Ergocornin voneinander abweicht. Aus den berechneten Geschwindigkeitskonstanten können die Gleichgewichtskonstanten ermittelt werden. Für $t \rightarrow \infty$ streben die Konzentrationen ihren Gleichgewichtswerten entgegen. Für $[A]_\infty$ und $[B]_\infty$ gilt:

$$[A]_\infty = \frac{k'}{k+k'}[A]_0 \text{ (Gl. 7) und } [B]_\infty = [A]_0 - [A]_\infty = \frac{k}{k+k'}[A]_0 \text{ (Gl. 8).}$$

Daraus folgt für die Gleichgewichtskonstante K der Reaktion:

$$K = \frac{[B]_\infty}{[A]_\infty} = \frac{k}{k'} \quad (\text{Gl. 9}).$$

Tabelle 13: Darstellung der Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten

Lösungsmittel	Analyt	k [h ⁻¹]	k' [h ⁻¹]	K
Acetonitril:Wasser + 10 mM	α -Ergocryptin	0,0157	0,0148	1,06
Ammoniumcarbammat (1:4, v:v) [78]	Ergocornin	0,0315	0,0167	1,89
Methanol + 10 mM	α -Ergocryptin	0,0069	0,0058	1,19
Ammoniumformiat (50:50, v:v) [60]	Ergocornin	0,0111	0,0055	2,03
Acetonitril:Wasser + 200 mg L ⁻¹	α -Ergocryptin	0,0016	0,0006	2,84
Ammoniumcarbammat (50:50, v:v) [88]	Ergocornin	0,0037	0,0022	1,68

In Tabelle 13 ist zu sehen, dass das Epimerisierungsverhalten von α -Ergocryptin und Ergocornin deutlich voneinander abweicht. Bei Ergocornin verläuft die Epimerisierung unabhängig vom verwendeten Lösungsmittel immer schneller als bei α -Ergocryptin.

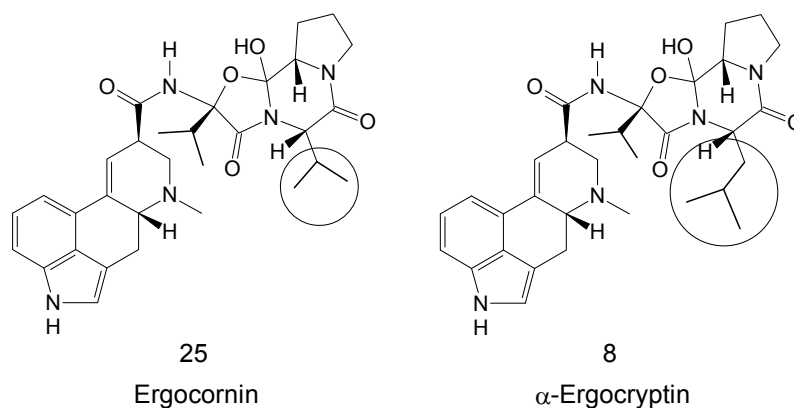


Abbildung 12: Strukturformeln von Ergocornin und α -Ergocryptin

Die Strukturen von Ergocornin und α -Ergocryptin unterscheiden sich lediglich in den in Abbildung 12 gekennzeichneten Gruppen (Ergocornin: iso-Propylgruppe; α -Ergocryptin: iso-Butylgruppe) im Tripeptidteil der Moleküle. Daher müssen die Unterschiede der Geschwindigkeitskonstanten k und k' im jeweils gleichen Lösungsmittelgemisch im unterschiedlichen sterischen Anspruch der iso-Propyl- bzw. iso-Butylgruppe begründet sein. Das Epimerengleichgewicht liegt bei Ergocornin und α -Ergocryptin in allen Lösungsmittelgemischen auf der Seite der (*S*)-Epimere. Zudem wird die Gleichgewichtskonstante vom verwendeten Lösungsmittel beeinflusst. Aufgrund der unterschiedlich zusammengesetzten Lösungsmittelgemische lässt sich allerdings keine Aussage darüber treffen, welches Lösungsmittel bzw. Salz hier welchen Einfluss auf das Epimerengleichgewicht hat.

5.1.3 Berechnungen zur Einstellung des Epimerengleichgewichtes von Ergotalkaloiden

Die unter 5.1.2 dargestellten Berechnungen hatten gezeigt, dass das Epimerengleichgewicht für die Ergotalkaloide α -Ergocryptin und Ergocornin in verschiedenen Lösungsmittelgemischen immer auf der Seite der (*S*)-Epimere liegt. Zur Erklärung dieser Beobachtung wurden Berechnungen zur Molekülstruktur von Ergotalkaloiden am Konrad-Zuse-Zentrum für Informationstechnik Berlin durchgeführt. Die Molekülstrukturen der beiden Epimere und der Übergangszustand wurden mit Hilfe der Software *ZIBGridfree* [102] optimiert und erlauben eine Erklärung für die Bevorzugung des (*S*)-Epimers. Die Berechnungen der Dihedralwinkel am C8-Atom wurden für die Lösungsmittel Wasser und Acetonitril durchgeführt. Sie zeigen, dass die (*R*)-Epimere im Vergleich zu den (*S*)-Epimeren eine flachere Struktur haben und sich damit näher an der flachen Struktur des Übergangszustandes (sp^2 -hybridisiertes C8-Atom)

befinden (Tabelle 14). Dadurch epimerisieren die (*R*)-Epimere leichter. Das führt zu einer Verschiebung des Gleichgewichts hin zum (*S*)-Epimer.

Tabelle 14: Mittlere Dihedralwinkel am C8-Atom und deren Varianz in Wasser und Acetonitril

	Wasser		Acetonitril	
	Winkel	Varianz [°]	Winkel [°]	Varianz [°]
α -Ergocryptin	139,74	9,67	142,68	8,31
Ergocornin	134,29	16,66	129,75	21,09
α -Ergocryptinin	105,86	6,22	76,05	5,95
Ergocorninin	105,73	6,45	106,52	6,32
α -Ergocryptin-Übergangszustand	169,60	7,90	103,49	4,26
Ergocornin-Übergangszustand	167,96	8,84	169,98	7,54

Durch die ähnlichen Geometrien des (*R*)-Epimers und des Übergangszustands ist der Phasenraum eingeschränkt mit einer großen Überlappung. Im Gegensatz dazu steht dem (*S*)-Epimer ein großer Phasenraum zur Verfügung mit einer Engstelle zum Übergangszustand (Abbildung 13).

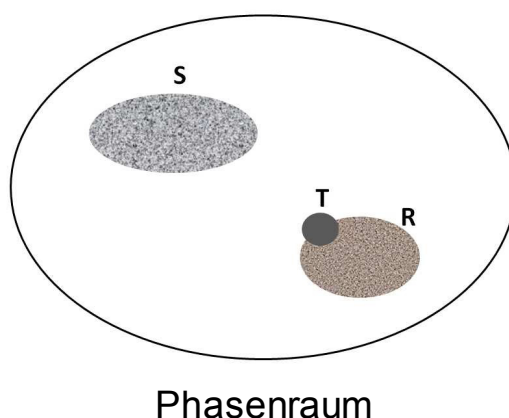


Abbildung 13: Darstellung des Phasenraumes für das (*R*)-Epimer R, das (*S*)-Epimer S und den Übergangszustand T

Um die Bevorzugung des (*S*)-Epimers erklären zu können, muss man daher zusätzlich den entropischen Anteil der chemischen Reaktion betrachten.

Die durchgeführten Berechnungen bestätigen die experimentell gefundenen Ergebnisse (Abschnitt 5.1.1), dass bei der Einstellung des Epimerengleichgewichts das (*S*)-Epimer bevorzugt ist und liefern erstmalig eine Erklärung für diese Beobachtung. Zudem zeigen die Berechnungen, dass sich die Lage des Epimerengleichgewichts aus den Molekülgeometrien der beiden Epimere und des Übergangszustandes ableitet.

5.2 Analysenverfahren zur epimerenspezifischen Quantifizierung von Ergotalkaloiden

Für die Entwicklung eines Analysenverfahrens zur epimerenspezifischen Quantifizierung der 12 prioritären Ergotalkaloide ist neben der chromatographischen Analyten-Trennung die Probenvorbereitung von besonderem Interesse.

5.2.1 Entwicklung eines Analysenverfahrens

Zur Reduzierung der Epimerisierung soll ein Analysenverfahren bei der Extraktion und dem anschließenden Clean-up auf den Zusatz starker Säuren oder Basen verzichten, da diese die Epimerisierung beschleunigen können [28,29].

5.2.1.1 Bestimmung von geeigneten Lösungsmittelgemischen für die epimerenspezifische Ergotalkaloidanalytik

Zur Entwicklung eines solchen Analysenverfahrens wurden Ergotalkaloide in verschiedenen in der Literatur beschriebenen Lösungsmittelgemischen hinsichtlich der jeweiligen Epimerisierungs-Geschwindigkeiten untersucht (Tabelle 12). Während der Probenvorbereitung werden, wie beispielsweise bei Müller *et al.* (2009) [53], für die verschiedenen Schritte des Analysenverfahrens, wie Extraktion (Ethylacetat:Methanol:Ammoniumhydroxid-Lösung (25 %ig) (75:5:7, v:v:v)) oder Lagerung der Proben vor der instrumentellen Analyse (Acetonitril:Wasser + 200 mg L⁻¹ Ammoniumcarbammat (50:50, v:v)) verschiedene Lösungsmittelgemische verwendet. Bei einem Analysenverfahren ist der Kontakt der Analyten am längsten in dem Zeitraum zwischen dem Abschluss der Probenvorbereitung und vor der instrumentellen Analyse. Das kann bei langen Messsequenzen mehrere Stunden bis Tage betragen. Daher wurden nachfolgend zur Untersuchung der Epimerisierungsrate in Abhängigkeit

vom Lösungsmittelgemisch solche Lösungsmittelgemische verwendet, in denen Ergotalkaloidextrakte vor der instrumentellen Analyse gelagert werden (Tabelle 12).

Die Experimente im Abschnitt 5.1.1 zum Epimerisierungsverhalten der Ergotalkaloide Ergocornin und α -Ergocryptin in verschiedenen Lösungsmittelgemischen hatten gezeigt, dass über einen Zeitraum von 96 Stunden in einem Gemisch aus 352 mM Natriumhexansulfonat in Acetonitril:Wasser (84:16, v:v) keine Epimerisierung beobachtet wird (Abbildung 9). Da es das Ziel war, ergotalkaloidhaltige Matrixextrakte mit Hilfe eines Kationenaustauscherharzes aufzureinigen, war dieses Lösungsmittelgemisch aufgrund der hohen Salzkonzentration ungeeignet für den Extraktionsschritt. Die Natrium-Ionen des Natriumhexansulfonats hätten die funktionellen Gruppen des Kationenaustauscherharzes belegt und somit eine Wechselwirkung der Ergotalkaloide mit dem Harz verhindert. Aus diesem Grund wurde Acetonitril:Wasser (84:16, v:v) für die Ergotalkaloidextraktion verwendet. Hier wurde eine sehr geringe Epimerisierung mit einem Anstieg des Anteils vom (*S*)-Epimer am Gesamtergotalkaloidgehalt von 4,3 % für Ergocornin und 2,3 % für α -Ergocryptin nach 96 Stunden beobachtet (Abbildung 9). Vor dem Hintergrund, dass die Extraktion der Ergotalkaloide aus der Matrix über eine einstündige Schüttelextraktion erfolgt und damit der Kontakt der Analyten mit dem verwendeten Lösungsmittel auf ca. eine Stunde begrenzt ist, wurde die geringe Epimerisierungsrate in Acetonitril:Wasser (84:16, v:v) als akzeptabel für den Extraktionsschritt der zu entwickelnden Probenvorbereitung angesehen.

5.2.1.2 Vergleich der Extraktionseffizienz verschiedener Lösungsmittelgemische

Durch die pK_a -Werte von Ergotalkaloiden, welche zwischen 4,8 und 6,2 liegen [1], befindet sich das Gleichgewicht in Lösung mit einem pH-Wert über dem pK_a -Wert auf der Seite der ungeladenen Spezies. Im Gegensatz dazu liegt das Gleichgewicht in Lösungen mit einem pH-Wert kleiner des pK_a auf der Seite der Ergotalkaloide, die an der N6-Position eine positive Ladung tragen. Dadurch können Ergotalkaloide mit unpolaren Lösungsmitteln unter basischen Bedingungen oder mit polaren Lösungsmitteln unter sauren Bedingungen extrahiert werden [80]. Bei dem von Krska *et al.* [75] entwickelten Analysenverfahren wurde das Lösungsmittelgemisch Acetonitril:Wasser + 200 mg L⁻¹ Ammoniumcarbonat (84:16, v:v) zur Ergotalkaloidextraktion verwendet. Das Analysenverfahren zeigte sehr gute Wiederfindungsraten für alle zwölf prioritären Ergotalkaloide (69-105 % bei 85 von 90 Wiederfindungsexpe-

rimenten). Daher konnte angenommen werden, dass die Extraktionseffizienz bei diesem Lösungsmittelgemisch mit basischem Modifier (Ammoniumcarbonat) sehr gut ist. Im folgenden Experiment wurde überprüft, wie hoch die Extraktionseffizienz des als optimal hinsichtlich geringer Epimerisierung identifizierten Lösungsmittelgemisches Acetonitril:Wasser (84:16, v:v) ist. Zur Beantwortung der Frage, ob bei der Extraktion von Ergotalkaloiden mit Acetonitril:Wasser (84:16, v:v) der Zusatz eines basischen Modifiers, wie er von Krska *et al.* [75] verwendet wurde, erforderlich ist, wurde ein mit Sklerotienmehl dotiertes Roggenmehl mit und ohne den Zusatz des basischen Modifiers Ammoniumcarbonat extrahiert.

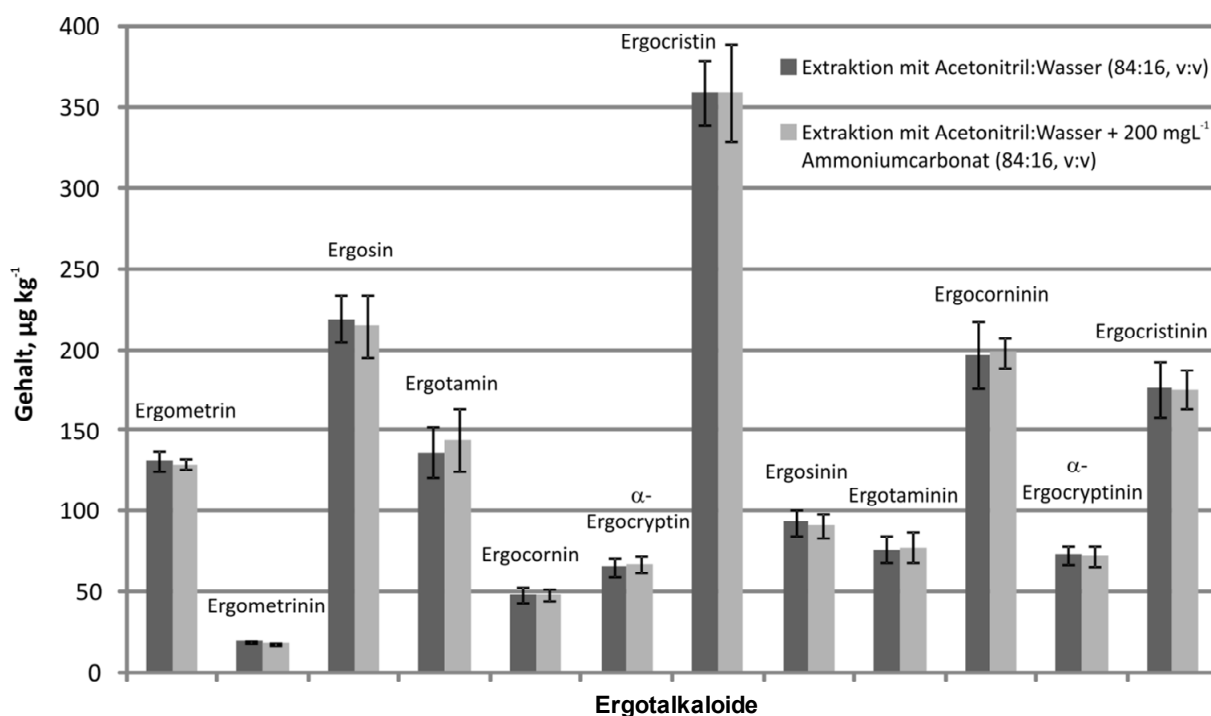


Abbildung 14: Extraktionsvergleich zwischen den Lösungsmitteln Acetonitril:Wasser (84:16, v:v) mit und ohne den Zusatz des basischen Modifiers Ammoniumcarbonat.

Der Extraktionsvergleich zeigte, dass es für keines der zwölf prioritären Ergotalkaloide einen signifikanten Unterschied in der Extraktionseffizienz ($n = 6$, Zwei-Stichproben-t-Tests, Irrtumswahrscheinlichkeit 0,05) zwischen basischer und neutraler Extraktion gab (Abbildung 14). Daher wurde das Lösungsmittelgemisch Acetonitril:Wasser (84:16, v:v) für das zu entwickelnde Analysenverfahren als Extraktionslösungsmittel ohne Modifier verwendet.

5.2.1.3 Entfernung von Matrixkomponenten

Zur Entfernung von Matrixkomponenten aus ergotalkaloidhaltigen Matrixextrakten wurden die Ergotalkaloide an eine feste Phase gebunden, wobei die Matrixkomponenten nicht mit dieser Phase wechselwirken und durch einen anschließenden Waschschrift eluiert/entfernt werden können. Als feste Phase diente ein makroporöses Kationenaustauscherharz (Strong Cation Exchange Resin (SCX)). Durch die pK_a -Werte der Ergotalkaloide (zwischen 4,8 und 6,2) liegen diese in der Extraktlösung zum Teil als positiv geladene Ionen vor und können somit über ionische Wechselwirkungen an die *p*-Toluolsulfonsäuregruppen des SCX-Harzes binden. Die von Curtui *et al.* [79], Ware *et al.* [103] oder Storm *et al.* [78] beschriebene Elution der Ergotalkaloide von einem SCX-Harz erfolgte mit Hilfe von 1 M NaOH-Lösung, eines methanolischen Phosphatpuffers (pH 9) bzw. einer methanolischen Ammoniumacetat/Natronlauge-Lösung (pH 10,2). Da diese Lösungsmittelgemische stark basisch sind, sollte deren Verwendung vermieden werden. Daher wurde das H^+ -beladene SCX-Harz vor Verwendung in seine Na^+ -Form überführt. Die Elution der Ergotalkaloide war durch Verdrängung mit Hilfe eines Na^+ -Salzes möglich, ohne dass sich dieses durch ein H^+ -SCX-Harz in seine korrespondierende Säure umwandelt und den pH-Wert der Lösung verändert.

Für die Überprüfung der Kapazität des Harzes wurde getestet, ob 200 mg des Harzes (Partikelgröße bzw. -durchmesser 320 - 595 μm) ausreichend sind, um Ergotalkaloide aus 2 mL einer Acetonitril-Stammlösung quantitativ zu binden. Es wurden Mischlösungen, die alle zwölf prioritären Ergotalkaloid-Standardsubstanzen enthielten, mit Gehalten von 20, 50 und 200 $\mu g\ kg^{-1}$ pro Analyt auf das Harz gegeben (entspricht einer Substanzmenge von 32, 79, 316 ng pro Analyt). In den Lösungen, welche nach Durchlaufen durch das Harz analysiert wurden, konnten nur noch geringe Mengen (maximal 8,2 $\mu g\ kg^{-1}$ bei Lösung mit Gehalt von 200 $\mu g\ kg^{-1}$) an Ergotalkaloiden nachgewiesen werden (Tabelle 15). Dieses entspricht einer Extraktionseffizienz für die Ergotalkaloidmischlösung mit einem Gehalt von 200 $\mu g\ kg^{-1}$ (50, 20 $\mu g\ kg^{-1}$) pro Analyt zwischen 91,8 und 98,5 % (94,4-99,3 %, 94,7-99,2 %). Die Testlösung mit dem Ergotalkaloidgehalt von 200 $\mu g\ kg^{-1}$ würde einem Gesamtergotalkaloidgehalt in einer Mehlprobe von 4800 $\mu g\ kg^{-1}$ entsprechen und ist in dieser Höhe nur im Ausnahmefall zu erwarten (Abschnitt 2.4).

Tabelle 15: Prozentualer Anteil der Ergotalkaloidgehalte in den Lösungen nach Extraktion mit Hilfe des makroporösen Na⁺-Kationenaustauscherharzes unter Variation der Parameter Ergotalkaloidgehalt, Partikelgröße und Extraktionszeit (n = 3).

Extraktionszeit	nicht kontrolliert					mind. 8 min	
Harzpartikelgröße [µm]	320 – 595			200 - 320	100 - 200	200 - 320	100 - 200
Ergotalkaloidgehalt in der Stammlsg. [µg kg ⁻¹]	200	50	20	20	20	20	20
Anteil der Ergotalkaloidgehalte in Stammlösung nach Harzextraktion, Standardabweichung in Klammern [%]							
Ergometrin	1,5 (0,2)	1,1 (0,2)	2,0 (0,5)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
Ergometrinin	1,7 (0,2)	0,7 (0,3)	0,8 (0,7)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
Ergosin	5,7 (0,2)	3,8 (1,0)	4,5 (2,3)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
Ergotamin	5,4 (0,2)	3,5 (1,0)	4,4 (1,9)	12,0 (11,6)	3,9 (7,1)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
Ergocornin	6,6 (0,2)	4,4 (1,1)	5,2 (3,4)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
α-Ergocryptin	7,2 (0,2)	5,2 (1,5)	5,3 (3,4)	10,2 (14,1)	1,6 (2,9)	4,7 (10,0)	0,0 (0,0)
Ergocristin	6,8 (0,2)	4,7 (1,2)	4,6 (3,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
Ergosinin	5,8 (0,2)	3,9 (1,0)	4,1 (2,8)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
Ergotaminin	5,4 (0,2)	3,6 (0,8)	3,9 (2,7)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
Ergocorninin	6,3 (0,2)	3,9 (1,1)	3,4 (3,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
α-Ergocryptinin	8,2 (0,2)	5,6 (1,6)	4,2 (3,6)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	2,5 (5,1)	0,0 (0,0)
Ergocristinin	8,1 (0,2)	5,4 (1,5)	4,1 (3,5)	0,5 (0,3)	0,5 (0,9)	2,6 (5,4)	0,0 (0,0)

Die Extraktionseffizienz für jedes einzelne Ergotalkaloid war bei den Mischlösungen mit den Gehalten von 50 und 20 µg kg⁻¹ nicht signifikant verschieden (Zwei-Stichproben-t-Tests, Irrtumswahrscheinlichkeit 0,05). Vor dem Hintergrund begrenzter Standardlösung wurde in weiteren Optimierungsschritten die Stammlösung mit einem Gehalt von 20 µg kg⁻¹ verwendet. Die Kapazität des Harzes wurde vom Hersteller mit 2,76 mmol g⁻¹ angegeben. Daher wurde davon ausgegangen, dass die Ergotalkaloidmengen, die auf das Harz gegeben wurden, quantitativ gebunden werden können. Eine mögliche Erklärung, warum die Ergotalkaloide nicht quantitativ aus der Lösung entfernt wurden, liefert die Struktur des Harzes. Es ist möglich, dass nur die funktionellen Gruppen an der Harzoberfläche für die Analyten zugänglich waren, was zu einer geringeren Kapazität bezüglich der Ergotalkaloide geführt haben kann. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde das Harz im nächsten Optimierungsschritt gemahlen, gesiebt und Korngrößen-Fractionen zwischen 200 und 320 µm und zwischen 100 und 200 µm verwendet. Vorteile der kleineren Partikel waren die größere Harzoberfläche und die geringere Durchflussgeschwindigkeit der Lösung durch die SPE-Kartusche (Solid Phase

Extraction, Festphasenextraktion). Bei den kleinsten Partikeln wurden die Ergotalkaloide bis auf Ergotamin, α -Ergocryptin und Ergocristinin vollständig an das Harz gebunden (Tabelle 15). Anschließend wurde die Durchflusszeit der Standardlösung auf mindestens 8 min erhöht unter Verwendung der Harzpartikelfractionen 200 - 320 μm und 100 - 200 μm . Bei den kleineren Partikeln (100 - 200 μm) konnten in der Lösung nach Durchlauf durch die SPE-Kartusche keine Ergotalkaloide (Nachweisgrenzen lagen zwischen 0,5 – 1,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$) nachgewiesen werden (Tabelle 15), was bedeutet, dass die Ergotalkaloide aus der Standardlösung quantitativ an das Harz gebunden wurden. Daher wurden für das Analysenverfahren die Partikel mit einer Korngröße zwischen 100 und 200 μm mit einer Mindestdurchflusszeit der Lösung durch die SPE-Kartusche von 8 min gewählt. Da die Harzpartikel nach Zugabe eines Acetonitril:Wasser (84:16, v:v) Extraktes quellen und sich damit die Durchflussgeschwindigkeit deutlich erniedrigt, wurde eine Durchlaufzeit von 15 min für 4 mL Extrakt als praktikabel festgelegt. Um auszuschließen, dass es zu einer Epimerisierung der Ergotalkaloide kommt, während diese an das Harz gebunden sind, wurde das hier entwickelte Analysenverfahren mit einem komplementären Analysenverfahren verglichen, das Matrixbestandteile mit Hilfe von basischem Aluminiumoxid aus ergotalkaloidhaltigen Extrakten entfernt [104] (Abschnitt 5.2.3). Die mit beiden Analysenverfahren quantifizierten Ergotalkaloidgehalte waren nicht signifikant verschieden. Aus diesem Ergebnis kann geschlussfolgert werden, dass der Kontakt der Ergotalkaloide mit Harz nicht zu einer Epimerisierung führt.

Zur Elution, das heißt zur quantitativen Verdrängung der Ergotalkaloide von dem SCX-Harz, sollte ein Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemisch verwendet werden, welches die folgenden drei Anforderungen erfüllt:

- Verminderte/keine Epimerisierung in dem Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemisch auch bei Raumtemperatur, um eine Lagerung über längere Zeit zu gewährleisten,
- Quantitative Elution der Ergotalkaloide von dem Harz,
- Kompatibilität der Lösung mit chromatographischen Systemen, damit die aufgearbeiteten Proben direkt analysiert werden können.

Da sich eine Acetonitril-Wasserlösung eignet, um alle sechs prioritären Ergotalkaloid-Epimerenpaare zu lösen, wurde ein solches Lösungsmittelgemisch unter Zugabe eines Salzes zur Elution verwendet. Die Kationen dieses Salzes sollten die funktionellen Gruppen, die *p*-

Toluolsulfonsäure (27, Abbildung 15), des Kationenaustauschers belegen und die Ergotalkaloide so quantitativ von dem Harz verdrängen und wieder in Lösung bringen (Abbildung 15).

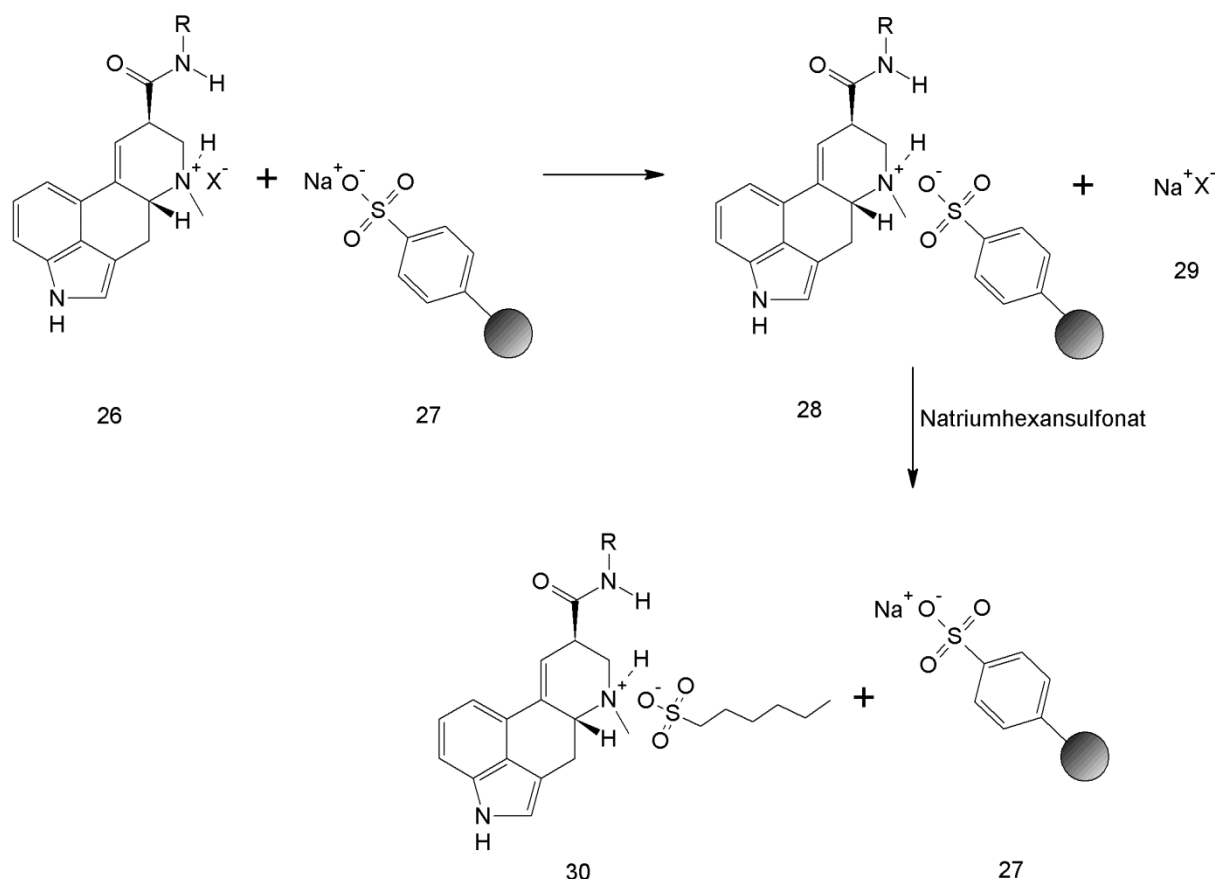


Abbildung 15: Schema zur Bindung von Ergotalkaloiden 26 an ein Na^+ -SCX-Harz 27 und anschließende Spaltung mittels Natriumhexansulfonat.

Hierfür musste das zu verwendende Salz in großem Überschuss vorliegen und sich daher gut in dem Acetonitril-Wassergemisch lösen. Lösungsversuche zeigten, dass sich bei Zugabe von anorganischen Salzen in Acetonitril:Wasser (84:16, v:v) schon bei geringen Mengen Zwei-Phasen-Systeme bilden. Daher wurden Natriumsalze linearer Alkylsulfonate (Tenside) mit kurzen Kettenlängen (C4, C5, C6) verwendet (Abbildung 16), da sich diese in dem Acetonitril-Wassergemisch lösen, ohne ein Zwei-Phasen-System zu bilden. Die Menge der in dem Lösungsmittelgemisch zu lösenden Tenside wurde so gewählt, dass sich eine maximale Menge an Tensid vollständig löst und bei einer Lagerung bei Raumtemperatur nicht auskristallisiert. Für die Substanzen Natriumhexan-, Natriumpentan- und Natriumbutansulfonat wurden jeweils 352, 416 und 640 mM Lösungen verwendet.

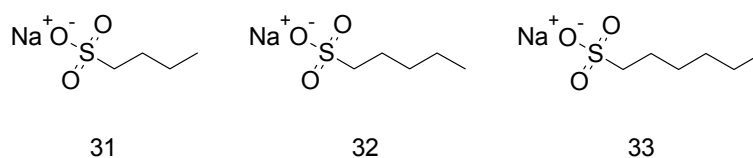


Abbildung 16: Lineare Alkylsulfonate: Natriumbutan- **31**, Natriumpentan- **32** und Natriumhexansulfonat **33**.

Ein weiterer Vorteil der Alkylsulfonate ist, dass diese keine Fluoreszenz zeigen und daher die Detektion der Ergotalkaloide mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors möglich ist. Zur Optimierung der Elution der Ergotalkaloide wurde das Kationenaustauscherharz, wie oben beschrieben, mit Ergotalkaloiden beladen und mit jeweils 2 mL Natriumhexansulfonat in Acetonitril:Wasser (84:16, v:v) eluiert. Hierbei wurde die Elutionszeit variiert (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 und 9 min, Tabelle 16). Die Daten für eine Elutionszeit von 3-9 min zeigten weder Ausreißer (Ausreißer-Test nach Grubbs, Irrtumswahrscheinlichkeit 0,05) noch Trends (Trend-Test nach Neumann, Irrtumswahrscheinlichkeit 0,05). Daher wird die Wiederfindungsrate mit einer Elutionszeit länger als 3 min nicht weiter erhöht. Bei der Elution der Ergotalkaloide von dem Kationenaustauscherharz konkurrieren Natriumionen und positiv geladenen Ergotalkaloiden um die negativ geladenen *p*-Toluolsulfonsäuregruppen des Harzes (Abbildung 15). Die Zugabe des Natriumhexansulfonats in einem sehr hohen Überschuss im Vergleich zu den Ergotalkaloiden führt zu einer Elution der Ergotalkaloide vom Harz.

Tabelle 16: Bestimmung der Wiederfindungsrate nach Variation der Elutionszeit unter Verwendung von 2 mL Natriumhexansulfonat (352 mM) in Acetonitril:Wasser (84:16, v:v), (n = 1).

	Elutionszeit [min]						
	2	3	5	6	7	8	9
	Wiederfindungsrate [%]						
Ergometrin	76,8	78,8	82,1	81,9	83,6	80,7	81,2
Ergometrinin	44,1	46,3	43,5	43,0	48,1	44,8	40,5
Ergosin	80,2	83,5	82,6	82,5	85,8	83,2	84,3
Ergotamin	78,1	82,0	80,6	81,4	83,0	80,9	82,9
Ergocornin	74,2	78,6	78,1	77,3	79,2	77,9	80,3
α -Ergocryptin	76,2	80,0	80,7	80,0	82,4	80,3	82,5
Ergocristin	72,7	76,2	77,7	76,9	78,5	77,5	79,2
Ergosinin	84,2	86,9	85,2	85,7	87,7	84,9	86,5
Ergotaminin	76,1	78,9	80,9	80,2	81,0	78,9	80,6
Ergocorninin	79,3	82,6	82,1	82,8	83,9	80,8	83,5
α -Ergocryptinin	82,0	85,3	84,3	84,2	86,8	83,6	85,7
Ergocristinin	76,6	80,1	81,0	80,4	82,2	79,9	82,0

Auffällig war, dass die Wiederfindungsrate bei Ergometrinin bei durchschnittlich $44,4 \pm 2,7 \%$ lag, wogegen die durchschnittliche Wiederfindungsrate der anderen Ergotalkaloide Werte zwischen $77,7 \pm 1,1$ (Ergocristin) und $85,0 \pm 1,2$ (α -Ergocryptinin) aufwiesen. Ergometrinin zeigte somit eine deutlich höhere Affinität zum Harz als die anderen Ergotalkaloide. Eine Erklärung hierfür liefert der pK_a -Wert von Ergometrinin, welcher mit 6,2 am höchsten im Vergleich zu den anderen Ergotalkaloiden ist [1] ((*R*)-Epimere: 5,5 (Ergocristin) bis 6,0 (Ergometrin) und (*S*)-Epimere 4,8 (Ergocorninin) bis 6,2 (Ergometrinin)). Die sich daraus ergebende Gleichgewichtseinstellung zwischen geladener und ungeladener Form führt beim Ergometrin zur stärksten Wechselwirkung mit den *p*-Toluolsulfonsäure-Gruppen des Harzes. Zur Optimierung der Elution der Ergotalkaloide wurde das Volumen der NatriumhexansulfonatLösung auf 4 mL erhöht (Tabelle 17). Für ein Volumen von 2 mL zeigten Elutionszeiten von 3-9 min keine Unterschiede in den Wiederfindungsraten. Die Elutionszeit wurde für das Volumen von 4 mL auf 15 min festgelegt, da sich die Durchflussgeschwindigkeit aufgrund der Quelfähigkeit des Harzes verringert. Die Wiederfindungsrate lag für Ergometrinin unter Verwendung der genannten Parameter bei $97,5 \pm 1,3 \%$. Die Tenside Natriumbutansulfonat und Natriumpentansulfonat wurden auch als mögliche Verbindungen zur Elution der Ergotalkaloide vom Harz getestet. Sie zeigten für Ergometrinin jedoch deutlich schlechtere Wiederfindungsraten (Tabelle 17) und wurden nicht weiter verwendet.

Tabelle 17: Bestimmung der Wiederfindungsraten unter Verwendung der Tenside Na^+ -Butan-, Na^+ -Pentan- und Na^+ -Hexansulfonat in der Elutionslösung ($n = 3$, $V = 4$ mL, Elutionszeit 15 min).

	Na^+ -Butansulfonat	Na^+ -Pentansulfonat	Na^+ -Hexansulfonat
	Wiederfindungsrate, Standardabweichung in Klammern [%]		
Ergometrin	92,8 (2,5)	102,2 (3,6)	92,5 (1,7)
Ergometrinin	76,8 (0,2)	83,5 (1,1)	97,5 (1,3)
Ergosin	84,8 (0,4)	89,0 (0,9)	91,8 (2,7)
Ergotamin	84,6 (0,5)	89,9 (1,1)	90,0 (3,2)
Ergocornin	95,0 (6,1)	92,4 (1,9)	103,4 (3,9)
α -Ergocryptin	88,5 (0,3)	89,3 (1,1)	90,4 (2,8)
Ergocristin	85,4 (0,7)	88,4 (1,1)	88,6 (2,8)
Ergosinin	93,3 (0,5)	92,4 (0,2)	93,1 (2,3)
Ergotaminin	90,0 (0,8)	93,0 (0,7)	92,8 (0,6)
Ergocorninin	96,3 (0,7)	92,6 (0,6)	92,9 (3,0)
α -Ergocryptinin	97,8 (0,4)	94,0 (0,0)	92,5 (2,5)
Ergocristinin	92,1 (0,4)	93,0 (0,7)	91,1 (2,4)

Zur Elution von Matrixbestandteilen von dem SCX-Harz wurde als Waschlösung Acetonitril:Wasser (84:16, v:v) eingesetzt. Da dieses Lösungsmittelgemisch bereits zur Extraktion verwendet wurde, lösen sich hierin auch Matrixkomponenten, welche nicht am Harz gebunden sind. Es wurde überprüft, ob sich in der Waschlösung Ergotalkaloide, welche zuvor an dem Harz gebunden waren, wieder lösen und dadurch die Wiederfindungsrate verringern. Hierfür wurden 5 und 10 mL Acetonitril:Wasser (84:16, v:v) zum Waschen verwendet (Tabelle 18).

Tabelle 18: Bestimmung der Wiederfindungsrate unter Verwendung von 5 und 10 mL Waschlösung (n = 3).

	Volumen der Waschlösung	
	5 mL	10 mL
	Wiederfindungsrate, Standardabweichung in Klammern [%]	
Ergometrin	95,5 (2,2)	94,3 (8,5)
Ergometrinin	85,5 (12,2)	83,5 (7,2)
Ergosin	88,7 (10,4)	90,7 (8,0)
Ergotamin	90,5 (11,7)	90,7 (6,3)
Ergocornin	99,4 (3,1)	90,4 (7,1)
α -Ergocryptin	92,4 (7,7)	91,9 (5,2)
Ergocristin	91,0 (10,0)	90,8 (5,5)
Ergosinin	101,4 (5,4)	100,6 (4,4)
Ergotaminin	98,7 (8,3)	100,8 (9,4)
Ergocorninin	103,6 (3,0)	102,5 (5,0)
α -Ergocryptinin	103,0 (3,8)	104,6 (5,3)
Ergocristinin	100,7 (7,1)	105,0 (4,9)

Es zeigte sich kein Unterschied in den Wiederfindungsraten (Zwei-Stichproben-t-Tests, Irrtumswahrscheinlichkeit 0,05), so dass davon ausgegangen werden kann, dass auch bei höheren Volumina der Waschlösung keine Ergotalkaloide vom Harz eluiert werden. Zur Überprüfung, wie groß das Volumen der Waschlösung sein muss, um z. B. die Roggenmatrixbestandteile von dem Kationenaustauscherharz zu entfernen, wurde eine ergotalkaloidfreie Roggenmatrix extrahiert. Der Extrakt wurde auf das Harz gegeben, mit 2, 5 und 10 mL gewaschen und anschließend mit der Natriumhexansulfonatlösung vom Harz eluiert.

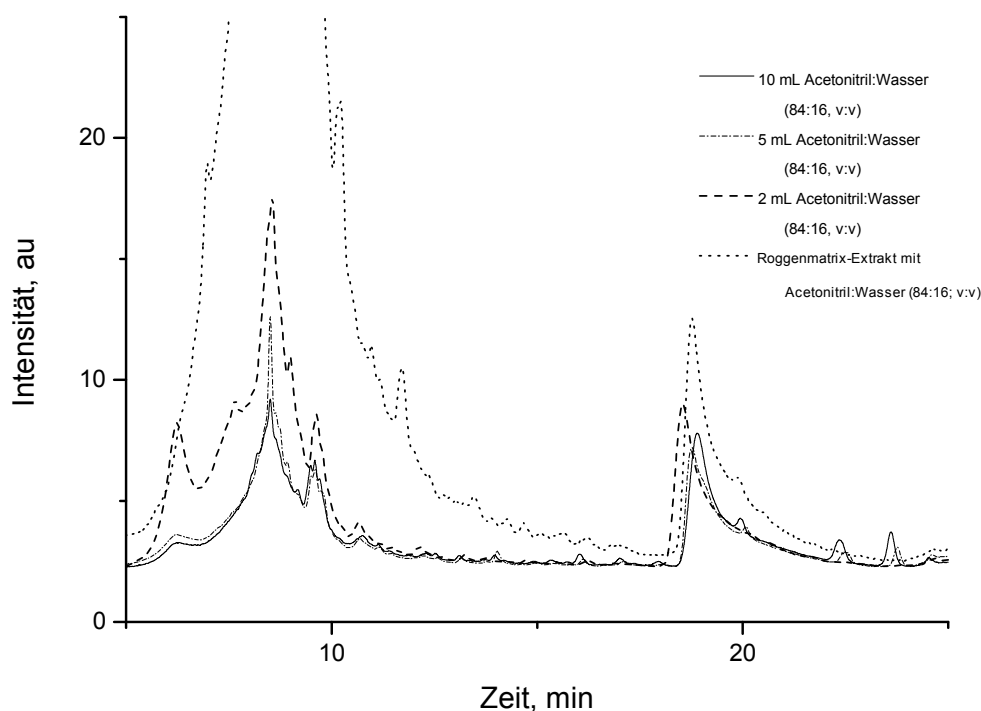


Abbildung 17: FLD-Chromatogramme einer ergotalkaloidfreien Roggenmatrix ohne Entfernung der Matrixkomponenten und nach Elution der Matrixkomponenten mit 2, 5 und 10 mL Acetonitril:Wasser.

Es zeigte sich eine deutliche Reduktion des Matrixsignals im FLD-Chromatogramm zwischen 2 und 5 mL Waschlösung, jedoch waren die Unterschiede zwischen 5 und 10 mL gering, so dass für das Analysenverfahren 5 mL zum Entfernen von Matrixkomponenten als ausreichend angesehen wurden (Abbildung 17).

5.2.2 Optimiertes Analysenverfahren zur Quantifizierung des Ergotalkaloidgehaltes in Roggenmehl

Das Schema des in dieser Arbeit optimierten Analysenverfahrens zur Quantifizierung von Ergotalkaloiden in Roggenmehl ist in Abbildung 18 dargestellt [105].

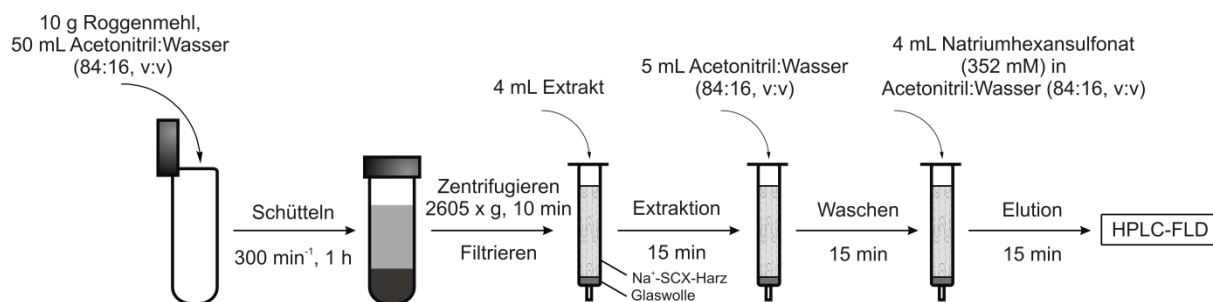


Abbildung 18: Schematische Darstellung des Analysenverfahrens zum Nachweis von Ergotalkaloiden in Roggenmehl.

Das entwickelte Analysenverfahren verzichtet bei der Extraktion auf den Zusatz von Säuren oder Basen und minimiert somit in diesem Schritt die Epimerisierung. Zur Entfernung der Matrix wird ein ergotalkaloidhaltiger Extrakt auf ein makroporöses Kationenaustauscherharz in seiner Na^+ -Form gegeben, an welches die Ergotalkaloide binden. Die Matrix wird mit dem Lösungsmittelgemisch Acetonitril-Wasser eluiert, ohne dass es zu einer Co-Elution der Ergotalkaloide kommt. Die Elution der Ergotalkaloide erfolgt mit Hilfe einer Natriumhexansulfonatlösung, in welcher die Ergotalkaloide auch in längeren Messsequenzen bei Raumtemperatur gelagert werden können, ohne dass eine Epimerisierung beobachtet wird. Die erhaltene Messlösung kann direkt in die HPLC injiziert werden. Die chromatographischen Bedingungen wurden von Müller *et al.* [88] übernommen, wobei die Flussrate und das Injektionsvolumen angepasst wurden.

5.2.3 Vergleich des entwickelten Analysenverfahrens mit dem §64 LFGB-Analysenverfahren

Das zuvor beschriebene neu entwickelte Analysenverfahren wurde mit dem in der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB) beschriebenen Analysenverfahren zur Bestimmung von Ergotalkaloiden in Roggen und Weizen verglichen [104]. Hierfür wurde der Ergotalkaloidgehalt in Roggenmehl mit beiden Analysenverfahren quantifiziert.

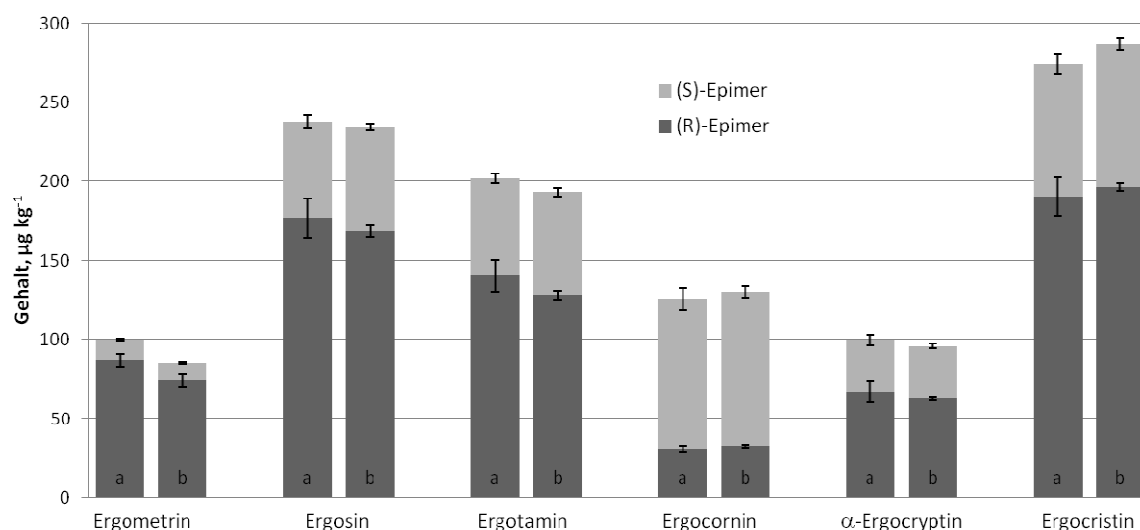


Abbildung 19: Ergotalkaloidgehalte in Roggenmehl quantifiziert mit (a) Analysenverfahren mit Probenvorbereitung unter Verwendung einer SCX-Harz (n = 6) und (b) mit dem Verfahren nach §64 LFGB (n = 5).

Bei den in der Abbildung 19 dargestellten Ergotalkaloidgehalten wurde für beide Analysenverfahren die Wiederfindungsrate nicht berücksichtigt, da in dem Analysenverfahren nach §64 LFGB die Wiederfindungsraten nur für die Matrix Weizenmehl [104] bestimmt sind und damit die Wiederfindungsraten für Roggenmehl nicht bekannt sind. Der Vergleich zeigt, dass der bestimmte Gesamtergotalkaloidgehalt mit $1038,6 \pm 58,9 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Verfahren mit SCX-Harz) und $1026,0 \pm 18,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Verfahren nach §64 LFGB) vergleichbar ist (Zwei-Stichproben-t-Tests, Irrtumswahrscheinlichkeit 0,05). In Abbildung 9 konnte gezeigt werden, dass es in dem bei dem Analysenverfahren nach §64 LFGB verwendeten Lösungsmittelgemisch (Acetonitril:Wasser + 200 mg L^{-1} Ammoniumcarbamate, 50:50 (v:v)) zu einer beschleunigten Epimerisierung kommt. Die in dem Verfahrenvergleich gemessenen Proben wurden unmittelbar nach der Aufarbeitung instrumentell analysiert. Betrachtet man die Verteilung der (R)- und (S)-Epimere, wird durch das §64 LFGB-Verfahren der Gesamtanteil der (R)-Epimere niedriger bestimmt als bei dem in dieser Arbeit vorgestellten Verfahren (Tabelle 19). Der Anteil des (R)-Epimers am jeweiligen Gesamtergotalkaloidgehalt unterscheidet sich jedoch bei beiden Verfahren nicht signifikant voneinander (Zwei-Stichproben-t-Tests, Irrtumswahrscheinlichkeit 0,05).

Tabelle 19: Darstellung des Anteils des (*R*)-Epimers am jeweiligen Gesamtergotalkaloidgehalt nach Bestimmung mit SCX-Harz Verfahren (n = 6) und dem Verfahren nach §64 LFGB (n = 3).

	<i>(R)</i> -Epimer/Summe (<i>R</i>)- und (<i>S</i>)-Epimer, Standardabweichung in Klammern [%]			
	Verfahren SCX-Harz		Verfahren §64 LFGB	
	Nach Aufarbeitung	Nach 4 Tagen	Nach Aufarbeitung	Nach 4 Tagen
Ergometrin(in)	87,2 (5,3)	86,8 (3,9)	86,9 (5,8)	78,6 (2,9)
Ergosin(in)	74,3 (6,7)	74,3 (4,7)	72,0 (2,0)	65,5 (2,1)
Ergotamin(in)	69,6 (6,1)	69,5 (5,2)	66,4 (2,0)	59,0 (2,4)
Ergocornin(in)	24,1 (2,0)	24,0 (1,6)	24,6 (1,0)	14,6 (0,6)
α -Ergocryptin(in)	67,6 (8,4)	68,0 (5,7)	65,5 (1,7)	58,0 (3,8)
Ergocristin(in)	69,5 (5,7)	68,9 (5,2)	68,3 (1,3)	52,1 (1,9)
Alle Ergotalkaloide	66,6 (2,6)	66,4 (2,1)	64,5 (0,9)	54,4 (1,0)

Zur Überprüfung der Stabilität der aufgearbeiteten Proben wurden die Extrakte für vier Tage bei Raumtemperatur gelagert und anschließend erneut instrumentell analysiert. Dieser Zeitraum wurde gewählt, da die Untersuchungen im Abschnitt 5.1.1 gezeigt hatten, dass innerhalb von 96 Stunden in dem Lösungsmittelgemisch 352 mM Natriumhexansulfonat in Acetonitril:Wasser (84:16; v:v) für Ergocornin und α -Ergocryptin keine Epimerisierung stattfand. Es zeigte sich, dass die Analyse der Proben nach vier Tagen für beide Analyseverfahren einen vergleichbaren Gesamtergotalkaloidgehalt lieferte (Zwei-Stichproben-t-Test, Irrtumswahrscheinlichkeit 0,05; $1023,8 \pm 27,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Verfahren mit SCX-Harz) und $1010,0 \pm 12,3 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Verfahren nach §64 LFGB)). Bei den Proben, welche nach dem Verfahren gemäß §64 LFGB aufgearbeitet wurden, kam es zu einer signifikanten (Zwei-Stichproben-t-Tests, Irrtumswahrscheinlichkeit 0,05) Verschiebung des Verhältnisses des (*R*)-Epimers zum jeweiligen Gesamtergotalkaloidgehalt auf die Seite des (*S*)-Epimers bei allen Analyten (Tabelle 19). Bei dem in dieser Arbeit vorgestellten neu entwickelten Analyseverfahren haben sich die Epimerenverhältnisse auch nach einer Probenlagerung über vier Tage bei Raumtemperatur nicht signifikant (Zwei-Stichproben-t-Tests, Irrtumswahrscheinlichkeit 0,05) verändert. Zur Vermeidung verfälschter Ergebnisse ist es sehr wichtig, Proben, die nach dem Verfahren gemäß §64 LFGB aufgearbeitet wurden, unverzüglich nach der Probenvorbereitung zu analysieren. Im Gegensatz dazu ist die unverzügliche Messung von Proben, die nach dem in dieser Arbeit entwickelten Analyseverfahren vorbereitet wurden, nicht erforderlich.

5.2.4 Quantifizierung des Ergotalkaloidgehaltes in Weizenkeimöl

Weizenkeimöl stellt eine interessante Matrix für die Quantifizierung des Ergotalkaloidgehaltes dar, da erstmals der Ergotalkaloidgehalt in dieser Matrix quantifiziert wurde. Des Weiteren verdeutlicht die Anwendung des entwickelten Analysenverfahrens auf die komplexe Matrix Weizenkeimöl eine Verwendbarkeit des Analysenverfahrens für verschiedene Matrices.

5.2.4.1 Anpassung des Analysenverfahrens an die Matrix Weizenkeimöl

Zur Anwendung des entwickelten Analysenverfahrens auf die Matrix Weizenkeimöl waren die folgenden Anpassungen nötig: Das in Weizenkeimöl enthaltene Phosphatidylcholin [106,107] wurde durch Verdünnung des Öls mit Aceton ausgefällt, da Phosphatidylcholin in Aceton unlöslich ist. Phosphatidylcholin, eine kationische Verbindung, wäre in Wechselwirkung mit den *p*-Toluolsulfonsäuregruppen des SCX-Harzes getreten [108]. Dieses hätte zu einer Belegung der funktionellen Gruppen des SCX-Harzes geführt, so dass die im Öl enthaltenen Ergotalkaloide nicht mehr quantitativ an das Harz gebunden worden wären. Des Weiteren diente die Zugabe von Aceton der Senkung der Viskosität des Öls. Das Aceton-Öl-Gemisch wurde direkt auf die SPE-Kartusche gegeben. Von Smith und Shappell [28] wurde anhand von α -Ergocryptin gezeigt, dass die Epimerisierungsrate in Aceton so gering ist (Abschnitt 2), dass sich nach drei Tagen ausgehend von reinem α -Ergocryptin nur 1 % α -Ergocryptinin gebildet hatte. Vor dem Hintergrund, dass die Ergotalkaloide in dem zu analysierenden Öl nur ca. 30 Minuten in Kontakt mit dem Aceton sind, wurde diese geringe Epimerisierungsrate als nicht relevant für die Epimerisierung während des Analysenverfahrens angesehen.

Zur Optimierung der Elution der Matrixbestandteile wurde die Auswirkung überprüft, die ein Wechsel des Lösungsmittels von Aceton zu Acetonitril:Wasser hat. Hierfür wurde eine Ergotalkaloid-Standardlösung in Acetonitril auf das Harz gegeben. Im Anschluss daran wurde das Harz mit Aceton gewaschen, um danach die Ergotalkaloide mit der Natriumhexansulfonat-Lösung zu eluieren. Hier konnten nur Wiederfindungsraten zwischen $16,5 \pm 25,1$ und $28,1 \pm 21,1$ % mit sehr großen Standardabweichungen bestimmt werden (Tabelle 20). Ein möglicher Grund für die niedrigen Wiederfindungsraten können Restmengen von Aceton sein, die in den Harzpartikeln verblieben sind. Dadurch könnte die Wechselwirkung der Natriumhexansulfonat-Lösung mit den funktionellen Gruppen des Kationenaustau-

scherharzes soweit verringert worden sein, dass eine Elution der Ergotalkaloide nur eingeschränkt möglich war.

Tabelle 20: Wiederfindungsraten bei Elution der Matrixbestandteile mit Aceton (n = 3).

	Wiederfindungsrate, Standardabweichung in Klammern [%]	
	ohne Trocknungsschritt	mit Trocknungsschritt
Ergometrin	22,9 (23,2)	88,0 (5,5)
Ergometrinin	28,1 (21,1)	80,6 (6,5)
Ergosin	20,0 (24,6)	72,6 (7,0)
Ergotamin	17,8 (26,1)	76,9 (7,0)
Ergocornin	23,2 (20,5)	86,3 (10,8)
α -Ergocryptin	18,8 (24,6)	71,2 (6,6)
Ergocristin	16,5 (25,4)	73,5 (6,8)
Ergosinin	22,2 (20,2)	84,2 (6,0)
Ergotaminin	23,7 (18,6)	86,3 (4,4)
Ergocorninin	24,1 (18,5)	93,8 (5,9)
α -Ergocryptinin	22,1 (20,4)	94,0 (7,4)
Ergocristinin	22,7 (19,5)	95,8 (6,3)

Dieser Optimierungsschritt wurde wiederholt, jedoch wurde diesmal das beladene Harz bevor und nachdem es mit Aceton gespült wurde unter vermindertem Druck getrocknet. Dadurch konnte die durchschnittliche Wiederfindungsrate auf Werte zwischen $71,2 \pm 6,6$ und $95,8 \pm 6,3$ % erhöht werden (Tabelle 20). Für das optimierte Analysenverfahren zur Quantifizierung von Ergotalkaloiden in Weizenkeimöl (Abbildung 20) wurde das Harz nur nach der Elution der Matrixbestandteile mit Aceton getrocknet, da zuvor das Öl bereits mit Aceton verdünnt war und somit hier kein Wechsel des Lösungsmittels stattfand.

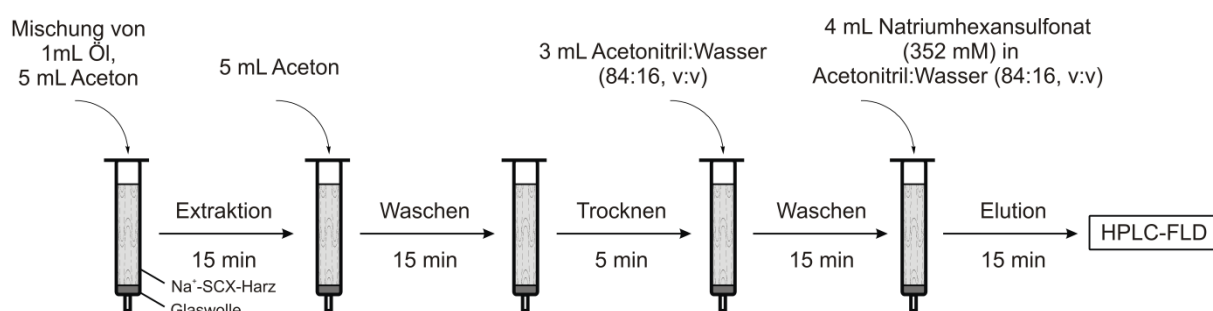


Abbildung 20: Schematische Darstellung des Analysenverfahrens zum Nachweis von Ergotalkaloiden in Speiseöl.

5.2.5 Validierung der Analysenverfahren zur Quantifizierung des Ergotalkaloidgehaltes

Linearität

Die Linearität innerhalb des Arbeitsbereiches wurde anhand einer 10-Punkt-Kalibriergerade nachgewiesen. Die Kalibriergeraden, das Quadrat des linearen Regressionskoeffizienten (R^2) und die Reststandardabweichung (s_y) für die jeweiligen Ergotalkaloide sind in Tabelle 21 dargestellt. Da die Bestimmung der Linearität mit Hilfe einer matrixfreien Kalibrierlösung aus 352 mM Natriumhexansulfonat in Acetonitril:Wasser (84:16; v:v) durchgeführt wurde, gelten die Validierungskenndaten für die Linearität und den Arbeitsbereich für die Matrices Roggenmehl und Rapsöl.

Tabelle 21: Darstellung der Validierungskenndaten für die Linearität.

	Linearität		
	Kalibriergeradengleichungen	R^2	s_y
Ergometrin	$y=14,731 \ x -5,115$	0,996	18,518
Ergometrinin	$y=18,883 \ x -7,003$	0,994	29,793
Ergosin	$y=5,762 \ x -2,868$	0,998	5,076
Ergosinin	$y=4,765 \ x +0,639$	0,998	3,603
Ergotamin	$y=14,294 \ x -6,053$	0,998	13,774
Ergotaminin	$y=9,222 \ x +0,516$	0,998	7,330
Ergocornin	$y=19,308 \ x -8,637$	0,997	19,650
Ergocorninin	$y=2,742 \ x -1,397$	0,998	2,331
α -Ergocryptin	$y=7,961 \ x -1,457$	0,998	6,125
α -Ergocryptinin	$y=7,857 \ x +0,054$	0,998	6,145
Ergocristin	$y=4,101 \ x +0,581$	0,999	2,925
Ergocristinin	$y=7,034 \ x -2,822$	0,998	6,385

Arbeitsbereich

Der Arbeitsbereich erstreckt sich über einen Gehalt in der tensidischen Extraktlösung von $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ bis $50 \mu\text{g kg}^{-1}$. Da es bei der Probenvorbereitung zu einer Verdünnung der ursprünglichen Matrix kommt, entspricht der Gehalt in der tensidischen Extraktionslösung einem Gehalt von $8 - 212 \mu\text{g kg}^{-1}$ in der Roggenmatrix (Verdünnungsfaktor 4,24) und einem Gehalt von $8 - 200 \mu\text{g kg}^{-1}$ in der Ölmatrix (Verdünnungsfaktor 4). Die Bestimmungsgrenze bildet den

unteren Wert des Arbeitsbereiches. Die obere Begrenzung des Arbeitsbereiches bei $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ würde bei Gleichverteilung aller zwölf prioritären Ergotalkaloide einen Gesamtergotalkaloidgehalt von $2544 \mu\text{g kg}^{-1}$ in Mehl abdecken. Dies deckt auch bei einer ungleichen Verteilung der Ergotalkaloide in einer Probe den abgeschätzten Ergotalkaloid-Maximalgehalt in Interventionsgetreide von $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Abschnitt 2.3) ab.

5.2.5.1 Validierung für die Matrix Roggenmehl

Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Festlegung der Nachweisgrenze (NG) und BG erfolgte über das Signal/Rausch-Verhältnis, wobei die NG bzw. BG der drei- bzw. zehnfachen Fläche des Rauschens entsprachen. Die NG liegen zwischen $0,3 - 0,8 \mu\text{g kg}^{-1}$ und die BG zwischen $0,7 - 2,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Tabelle 22).

Tabelle 22: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Matrix Roggenmehl.

Roggenmehl						
	Ergometrin	Ergometrinin	Ergosin	Ergosinin	Ergotamin	Ergotaminin
NG [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	0,6	0,5	0,4	0,7	0,3	0,3
BG [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	1,8	1,7	1,4	1,9	1,1	0,7
	Ergocornin	Ergocorninin	α -Ergocryptin	α -Ergocryptinin	Ergocristin	Ergocristinin
NG [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	0,3	0,8	0,5	0,4	0,5	0,8
BG [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	1,0	1,9	1,2	1,1	1,4	2,0

Da die NG/BG für die einzelnen Ergotalkaloide in der Leerwertprobe unterschiedlich hoch sind, wurde der Arbeitsbereich bei dem Massenanteil festgelegt, bei dem der Analyt mit der höchsten BG noch quantifiziert werden kann ($2 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Wiederfindungsrate

Die Bestimmung der Wiederfindungsraten der Analyten über das gesamte Analysenverfahren erfolgte durch Dotieren einer ergotalkaloidfreien Roggenmehlmatrix. Die ermittelten Wiederfindungsraten sind in Tabelle 23 dargestellt.

Tabelle 23: Wiederfindungsraten für dotiertes Roggenmehl mit Ergotalkaloidgehalten von 2, 30 und 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (n = 6).

	Gehalt [$\mu\text{g kg}^{-1}$]		
	2	30	50
	Wiederfindungsrate, Standardabweichung in Klammern [%]		
Ergometrin	114,4 (1,6)	100,9 (1,3)	90,9 (0,8)
Ergometrinin	106,4 (3,9)	97,5 (4,0)	87,3 (1,5)
Ergosin	111,5 (2,0)	91,8 (2,9)	86,4 (1,6)
Ergosinin	117,5 (8,2)	95,6 (2,4)	97,5 (1,5)
Ergotamin	104,7 (1,6)	86,9 (3,5)	81,3 (2,0)
Ergotaminin	107,6 (4,7)	120,2 (2,3)	105,6 (1,7)
Ergocornin	100,5 (1,5)	86,7 (2,5)	80,3 (1,2)
Ergocorninin	97,6 (2,1)	83,8 (1,1)	91,0 (1,2)
α -Ergocryptin	95,1 (5,3)	89,7 (2,5)	85,1 (1,1)
α -Ergocryptinin	103,6 (2,8)	113,2 (1,5)	102,6 (1,2)
Ergocristin	82,9 (4,2)	81,4 (2,7)	85,5 (1,5)
Ergocristinin	111,8 (5,2)	111,0 (1,9)	104,8 (1,7)

Beim Vergleich der Wiederfindungsraten zwischen 2 und 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ist, außer für Ergotaminin, α -Ergocryptinin und Ergocristin, eine Verringerung der Wiederfindungsraten zu erkennen. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt ist, dass Ergotalkaloide und kationische Matrixbestandteile um die *p*-Toluolsulfonsäure-Gruppen des Kationenaustauscherharzes konkurrieren. Bei höheren Ergotalkaloidgehalten in der Extraktionslösung können die Ergotalkaloide nicht mehr quantitativ an das SCX-Harz gebunden werden, was eine verringerte Wiederfindungsrate zur Folge hat. Die Wiederfindungsraten lagen zwischen 80 und 120 %. Da es bislang keine Grenzwertregelungen für Ergotalkaloidgehalte in der Europäischen Union gibt [41], können zur Einordnung der bestimmten Validierungskennzahlen die Vorgaben der Europäischen Union für andere Mykotoxine herangezogen werden, für die bereits Grenzwerte festgelegt wurden. In der Verordnung EG 401/2006 [81] sind die Kriterien der Analysemethoden für die Mykotoxine festgelegt, die der offiziellen Kontrolle unterliegen. So liegen die geforderten Wiederfindungsraten für Analyseverfahren je nach Mykotoxin und Gehalt zwischen 50 und 130 %. Im Vergleich zu anderen in der Literatur beschriebenen Verfahren zum Nachweis von Ergotalkaloiden (Tabelle 2) sind die Wiederfindungsraten bei dem hier entwickelten Verfahren als sehr gut einzuschätzen.

Messpräzision

Die Ergotalkaloidgehalte und die ermittelte Präzision innerhalb der Serien und zwischen den Serien sind in Tabelle 24 dargestellt.

Tabelle 24: Messpräzision für ein mit Sklerotienmehl dotiertes Roggenmehl (n = 6).

	Ergometrin	Ergometrinin	Ergosin	Ergosinin	Ergotamin	Ergotaminin
Gehalt ^a [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	113,6	21,1	204,0	74,1	177,8	64,1
Präzision innerhalb der Serien [%]	6,9	5,1	8,5	6,8	9,0	8,9
Präzision zwischen den Serien [%]	2,4	0,8	3,4	11,8	1,4	8,0

	Ergocornin	Ergocorninin	α -Ergocryptin	α -Ergocryptinin	Ergocristin	Ergocristinin
Gehalt ^a [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	33,7	134,1	68,9	37,5	198,1	110,7
Präzision innerhalb der Serien [%]	10,5	8,2	7,1	8,8	7,9	7,1
Präzision zwischen den Serien [%]	2,6	9,2	3,7	12,8	2,4	2,5

^a Ein mit Sklerotienmehl dotiertes Roggenmehl wurde an fünf verschiedenen Tagen aufgearbeitet (n = 6)

Die hier ermittelten Daten für die Präzision liegen zwischen 5,1 - 10,5 % (Präzision innerhalb der Serien) und 0,8 - 12,8 % (Präzision zwischen den Serien) und sind damit alle unter dem niedrigsten geforderten Wert aus den Vorgaben in der Verordnung EG 401/2006 [81]. Dort werden Werte für die Präzision innerhalb der Serien zwischen 15 und 40 % (je nach Mykotoxin und Gehalt) genannt.

5.2.5.2 Validierung für die Matrix Rapsöl

Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Festlegung der NG und BG erfolgte analog zu der unter 5.2.5.1 beschriebenen Vorgehensweise über das Signal/Rausch-Verhältnis. Die NG liegen zwischen 0,2 - 0,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ und die BG zwischen 0,7 - 2,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Tabelle 25).

Tabelle 25: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für Rapsöl (n = 6).

Speiseöl						
	Ergometrin	Ergometrinin	Ergosin	Ergosinin	Ergotamin	Ergotaminin
NG [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	0,3	0,2	0,6	0,6	0,3	0,3
BG [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	1,0	0,7	2,0	1,8	0,9	0,8
	Ergocornin	Ergocorninin	α -Ergocryptin	α -Ergocryptinin	Ergocristin	Ergocristinin
NG [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	0,3	0,7	0,7	0,5	0,7	0,8
BG [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	0,8	1,8	1,9	1,4	2,0	2,0

Da die NG/BG für die einzelnen Ergotalkaloide unterschiedlich hoch sind, wurde der Arbeitsbereich bei dem Massenanteil festgelegt, bei dem der Analyt mit der höchsten BG noch quantifiziert werden kann ($2 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Wiederfindungsrate

Die Bestimmung der Wiederfindungsrate des Analysenverfahrens wurde durch Dotieren eines Speiseöls bestimmt. Da hierfür kein ergotalkaloidfreies Weizenkeimöl zur Verfügung stand, wurde die Wiederfindungsrate anhand eines Rapsöls bestimmt. Da Raps zur Familie der Kreuzblütengewächse (*Brassicaceae*) gehört, dient er nicht als Wirtspflanze für *C. purpurea*. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass Rapsöl ergotalkaloidfrei ist. Dieses wurde durch die Aufarbeitung und Analyse des undotierten Rapsöls nachgewiesen. Das Öl wurde so dotiert, dass die Gehalte in der Natriumhexansulfonatlösung nach der Aufarbeitung bei 2, 30 und $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ lagen und sich somit am unteren Ende, in der Mitte und am oberen Ende des Arbeitsbereiches befanden. Die bestimmten Wiederfindungsraten sind in Tabelle 26 dargestellt. Die Wiederfindungsraten liegen zwischen 71 und 96 %, wobei die mittlere Wiederfindungsrate bei 81 % liegt. Damit ist die mittlere Wiederfindungsrate für die Matrix Rapsöl geringer als für die Matrix Roggenmehl (97 %), erfüllt aber die laut Verordnung EG 401/2006 [81] geforderten Anforderungen an die Wiederfindungsraten (50 – 130 %) von Analysenverfahren für die amtliche Kontrolle des Mykotoxingehaltes in Lebensmitteln.

Tabelle 26: Wiederfindungsraten für dotiertes Rapsöl mit Gehalten von 2, 30 und 50 µg kg⁻¹ (n = 6)

	Wiederfindungsrate, Standardabweichung in Klammern [%]		
	2 µg kg ⁻¹	30 µg kg ⁻¹	50 µg kg ⁻¹
Ergometrin	80,1 (6,4)	78,1 (2,3)	87,1 (2,3)
Ergometrinin	70,7 (2,7)	75,3 (3,7)	82,5 (2,2)
Ergosin	75,8 (3,1)	74,7 (2,2)	79,1 (2,3)
Ergosinin	82,3 (3,5)	84,8 (1,2)	86,5 (0,7)
Ergotamin	75,7 (2,4)	71,9 (2,0)	78,4 (2,9)
Ergotaminin	78,0 (5,5)	84,2 (1,5)	85,5 (1,0)
Ergocornin	72,7 (3,5)	75,7 (1,9)	79,5 (2,4)
Ergocorninin	95,7 (4,1)	89,6 (2,4)	84,8 (0,8)
α-Ergocryptin	78,0 (7,5)	78,5 (2,1)	82,0 (4,1)
α-Ergocryptinin	89,4 (5,9)	84,7 (1,8)	86,5 (1,1)
Ergocristin	72,7 (6,0)	72,2 (0,9)	76,5 (1,7)
Ergocristinin	77,5 (6,2)	86,6 (1,7)	87,9 (1,4)

Die niedrigere Wiederfindungsrate im Vergleich zu den bei der Matrix Roggenmehl bestimmten Wiederfindungsraten könnte mit dem Wechsel des Lösungsmittels von Aceton auf das Acetonitril-Wassergemisch zusammenhängen. Die Experimente zur Optimierung der Wiederfindungsrate hatten gezeigt, dass eine Trocknung des Harzes vor Verwendung des Lösungsmittelgemisches Acetonitril-Wasser von Vorteil ist. Trotz eines fünfminütigen Trocknungsschrittes können Reste von Aceton in den Harzpartikeln verblieben sein, was zu den verringerten Wiederfindungsraten geführt haben kann. Ein Trend zu geringeren Wiederfindungsraten bei höheren Ergotalkaloidgehalten ist bei Rapsöl im Gegensatz zum Roggenmehl nicht zu erkennen. Eine mögliche Erklärung hierfür kann die unterschiedliche Matrixzusammensetzung von Rapsöl und Roggenmehl liefern. Durch die Zugabe von Aceton zur Rapsölmatrix wurde die kationische Substanz Phosphatidylcholin ausgefällt, so dass weniger kationische Bestandteile enthalten sind, die mit den Ergotalkaloiden um die freien *p*-Toluolsulfonsäure-Gruppen konkurrieren. Da der Nachweis von Ergotalkaloiden in Weizenkeimöl hier erstmalig beschrieben wird, ist ein Vergleich der ermittelten Wiederfindungsraten mit Literaturwerten nicht möglich.

Messpräzision

Da für die Bestimmung der Messpräzision beim Weizenkeimöl weder ein ergotalkaloidfreies noch ein mit allen zwölf prioritären Ergotalkaloiden natürlich kontaminiertes Weizenkeimöl

verfügbar war, wurde die Messpräzision anhand eines ergotalkaloidfreien Speiseöls (Rapsöl) mittels Dotierung ($30 \mu\text{g kg}^{-1}$) und anschließender Aufarbeitung von je sechs Proben an fünf verschiedenen Tagen bestimmt. Die Ergotalkaloidgehalte und die ermittelte Präzision innerhalb und zwischen den Serien sind in Tabelle 27 dargestellt.

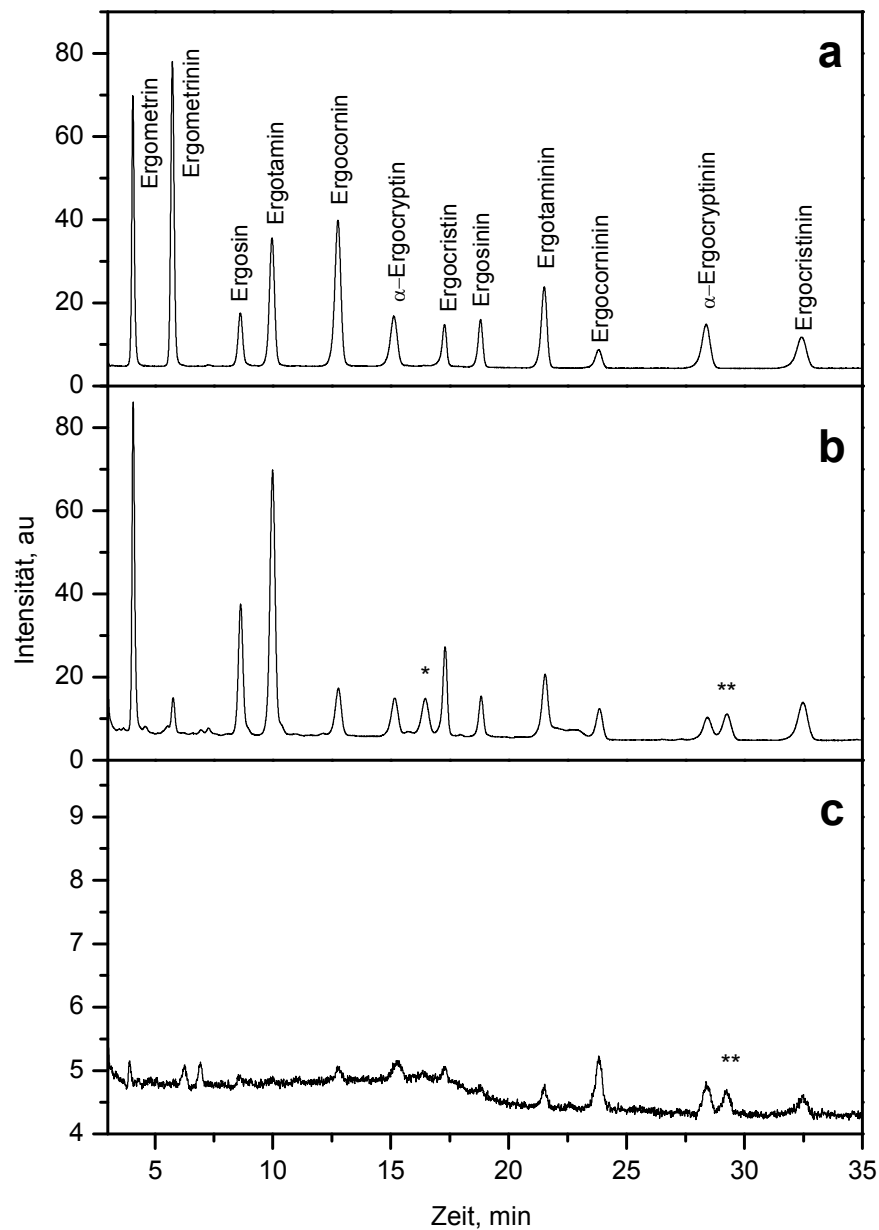
Tabelle 27: Messpräzision für ein dotiertes Rapsöl, Dotierlevel $30 \mu\text{g kg}^{-1}$ pro Analyt.

	Ergometrin	Ergometrinin	Ergosin	Ergosinin	Ergotamin	Ergotaminin
Präzision innerhalb der Serien [%]	2,1	3,6	2,9	2,0	2,8	1,5
Präzision zwischen den Serien [%]	4,4	2,9	2,6	0,8	3,3	1,0
	Ergocornin	Ergocorninin	α -Ergocryptin	α -Ergocryptinin	Ergocristin	Ergocristinin
Präzision innerhalb der Serien [%]	2,6	2,7	5,0	2,3	2,1	2,3
Präzision zwischen den Serien [%]	1,7	1,8	2,6	1,5	3,1	2,2

Die für Rapsöl ermittelten Daten zur Messpräzision liegen zwischen 1,5 - 5,0 % (Präzision innerhalb der Serien) und 0,8 - 4,4 % (Präzision zwischen den Serien) und damit alle unter dem niedrigsten geforderten Wert aus den Vorgaben der Europäischen Union zwischen 15 - 40 % [81]. Damit sind die ermittelten Präzisionsdaten niedriger als die für die Matrix Roggenmehl. Ein möglicher Grund hierfür ist, dass die Präzision für Roggenmehl anhand eines mit Sklerotienmehl dotierten Roggenmehls bestimmt wurde. Dass heißt, die Ergotalkaloide in dem Roggenmehl sind an Partikeln (Sklerotienmehl) gebunden, die sich nicht so homogen im Mehl verteilen lassen, wie es bei dem Dotieren des Öls mit einer ergotalkaloidhaltigen Lösung (Stammlösung) möglich ist.

5.2.6 Anwendung des Analysenverfahrens auf Realproben

Nach der Entwicklung und Optimierung des Analysenverfahrens für die Matrices Roggenmehl und Weizenkeimöl wurden jeweils vier Realproben auf ihren Ergotalkaloidgehalt hin analysiert (Tabelle 28). Beispielchromatogramme einer Standardlösung und von Matrixproben (Roggenmehl und Weizenkeimöl) sind in Abbildung 21 dargestellt.



*/** β -Ergocryptin(in)

Abbildung 21: FLD-Chromatogramme von (a) Mischung von 12 Ergotalkaloid-Standards mit $30 \mu\text{g kg}^{-1}$ pro Verbindung, (b) mit Sklerotien dotiertes Roggenmehl ($1745,6 \pm 4,5 \mu\text{g kg}^{-1}$) und (c) natürlich kontaminiertes Weizenkeimöl ($19,5 \pm 1,1 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Die in Roggenmehl gefundenen Ergotalkaloidgehalte mit einem maximalen Gesamtergotalkaloidgehalt von $130,9 \pm 11,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ sind gering im Vergleich zu den in der Literatur publizierten Werten (Abschnitt 2.4). Hier wurden in unterschiedlichen Erntejahren deutlich höhere Maximalgehalte von $3280 \mu\text{g kg}^{-1}$ (2003, [54]), $974,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ (2004, [54]) und $714 \mu\text{g kg}^{-1}$ (2006/2007, [53]) gefunden. Gründe für die hohen Maximalgehalte im Jahr 2003 können zum einen in dem schwankenden Ergotalkaloidgehalt in Sklerotien liegen. Zum anderen sind Größe und Färbung der Sklerotien auch von klimatischen Bedingungen abhängig (Abschnitt 1.1). Durch den heißen und trockenen Sommer 2003 waren die Sklerotien sehr klein und hell, so dass ein Abtrennen durch Größenselektion oder Farbausleser („jedes einzelne Getreidekorn [wird] in Farbauslesern mit Laserstrahlen verschiedener Wellenlänge optisch erfasst, bewertet und bei farblicher Abweichung aus dem Getreidestrom mit 4 atm Druckluft herausgeschossen“) nur schwer möglich war [3]. Die klimatischen Bedingungen im Erntejahr (2011/2012) der hier analysierten Roggenmehlproben können zu den geringen Gehalten geführt haben.

Tabelle 28: Ergotalkaloidgehalte der analysierten Roggenmehle und Weizenkeimöle (n = 3).

Ergotalkaloidgehalt, Standardabweichung in Klammern [$\mu\text{g kg}^{-1}$]						
	Ergometrin	Ergometrinin	Ergosin	Ergosinin	Ergotamin	Ergotaminin
Öl						
1	*	*	*	*	*	*
2	*	*	*	*	*	*
3	*	*	*	**	*	*
4	*	*	*	*	*	*
Roggenmehl						
1	**	*	**	*	**	*
2	*	*	*	*	*	*
3	8,7 (0,1)	**	20,4 (1,8)	10,3 (0,9)	16,6 (0,5)	**
4	*	*	**	*	**	*
	Ergocornin	Ergocorninin	α -Ergocryptin	α -Ergocryptinin	Ergocristin	Ergocristinin
Öl						
1	*	*	**	*	*	*
2	*	18,3 (0,6)	**	**	*	**
3	*	12,0 (0,7)	**	**	*	7,4 (0,4)
4	*	7,8 (0,9)	**	**	*	**
Roggenmehl						
1	*	*	*	*	**	*
2	*	*	*	*	**	*
3	**	18,7 (3,1)	12,7 (0,4)	8,4 (1,6)	24,8 (2,7)	10,4 (0,4)
4	*	*	*	*	**	*

* Gehalt < NG, ** NG < Gehalt < BG

Zur Einordnung der Ergotalkaloidgehalte der analysierten Weizenkeimöle können keine Literaturvergleiche durchgeführt werden, da Weizenkeimöl bisher noch nicht auf seinen

Ergotalkaloidgehalt hin untersucht wurde. Die ermittelten Gehalte von maximal $19,5 \pm 1,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ Gesamtergotalkaloidgehalt sind jedoch sehr gering und vor dem Hintergrund der geringen Verzehrmenge von Weizenkeimöl als unbedenklich einzuschätzen. Da aber die analysierten Roggenmehle auch nur sehr niedrige Ergotalkaloidgehalte hatten, kann der geringe Gehalt in Weizenkeimöl auch mit einem generell sehr niedrigen Ergotalkaloidgehalt in dem Erntejahr 2011/2012 zusammenhängen. Aufgrund der geringen Anzahl von analysierten Proben ($n = 4$) kann keine generelle Aussage zum Ergotalkaloidgehalt in Weizenkeimöl getroffen werden. Daher sollte Weizenkeimöl mit einer größeren Probenanzahl in Zukunft auf seinen Ergotalkaloidgehalt analysiert werden, um dessen Belastung mit Ergotalkaloiden besser einschätzen zu können. Es ist denkbar, dass klimatische Bedingungen ähnlich wie im Jahr 2003 nicht nur zu einer hohen Ergotalkaloidbelastung von Roggenmehl sondern auch zu hohen Ergotalkaloidgehalten in Weizenkeimöl führen.

5.3 Epimerisierungs- und Abbauverhalten durch Backen und im *in vitro* Verdaumodell

5.3.1 Epimerisierung/Abbau von Ergotalkaloiden durch den Backprozess

Zur Untersuchung des Epimerisierungs- und Abbauverhaltens von Ergotalkaloiden durch den Backprozess wurden zwei verschiedene Matrices untersucht. Es wurden Modellbackversuche im Labor durchgeführt und als zweite Matrix Brote unter realen Bedingungen gebacken. Bei beiden Matrices wurden die verwendeten Roggenmehle vor dem Backen mit Sklerotienmehl dotiert.

5.3.1.1 Epimerisierung/Abbau von Ergotalkaloiden durch Modellbackversuche

Durch das Backen von Keksen verringerte sich der Ergotalkaloidgehalt in den Proben. Das Verhältnis zwischen (*R*)- und (*S*)-Epimer verschob sich bei allen Ergotalkaloiden zu dem biologisch inaktiven (*S*)-Epimer. Hierbei führte eine verlängerte Backzeit zu einem verstärkten Abbau sowie zu einer weiteren Verschiebung des Epimerenverhältnisses hin zum (*S*)-Epimer (Abbildung 22).

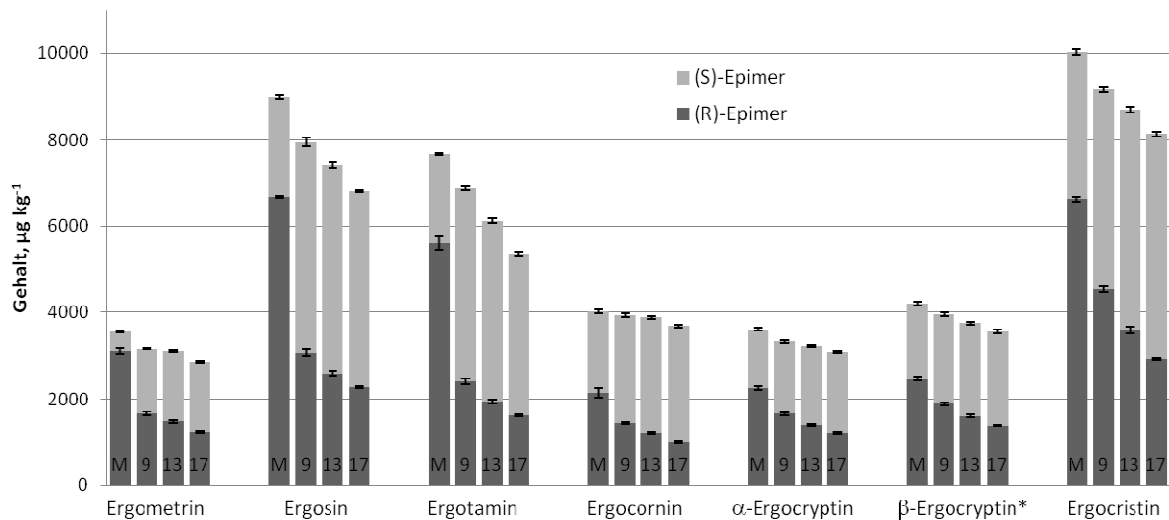


Abbildung 22: Ergotalkaloidgehalte in Mehl (M) und in Keksen nach einer Backzeit von 9 min, 13 min sowie 17 min.

Das stabilste Ergotalkaloid mit einem Abbau $1,9 \pm 3,3$, $3,4 \pm 3,2$ und $8,4 \pm 3,3$ % war Ergocornin(in) für die jeweiligen Backzeiten von 9, 13 und 17 min. Der stärkste Abbau wurde für Ergosin(in) beobachtet mit $11,5 \pm 1,5$ % (Backzeit 9 min) und Ergotamin(in) mit $20,2 \pm 2,1$ % und $30,2 \pm 2,1$ % (Backzeiten von 13 und 17 min). Im Gegensatz zu bisher beschriebenen Ergebnissen, wo eine Verschiebung des Epimerenverhältnisses durch Hitzebehandlung nur für die Ergopeptine beobachtet wurde [64], konnte bei den hier durchgeführten Versuchen eine Verschiebung des Epimerenverhältnisses für alle Ergotalkaloide, einschließlich des einfachen Lysergsäureamids Ergometrin(in) festgestellt werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Backprozess zu einer Verringerung des Gehaltes an toxikologisch relevanten (R)-Epimeren sowohl durch Abbauprozesse als auch durch Epimerisierung führt.

5.3.1.2 Epimerisierung/Abbau von Ergotalkaloiden durch Backen von Brot

Auch in der Brotmatrix verringerte sich der Gehalt aller Ergotalkaloide durch das Backen. Wie in der Keksmatrix kam es auch hier zu einer Verschiebung des Epimerenverhältnisses zum biologisch inaktiven (S)-Epimer. Das stabilste Ergotalkaloid war das α-Ergocryptin(in) mit einem Abbau von $1,8 \pm 4,6$ %. Der höchste Abbau wurde bei Ergosin(in) mit $25,2 \pm 6,3$ % beobachtet (Abbildung 23).

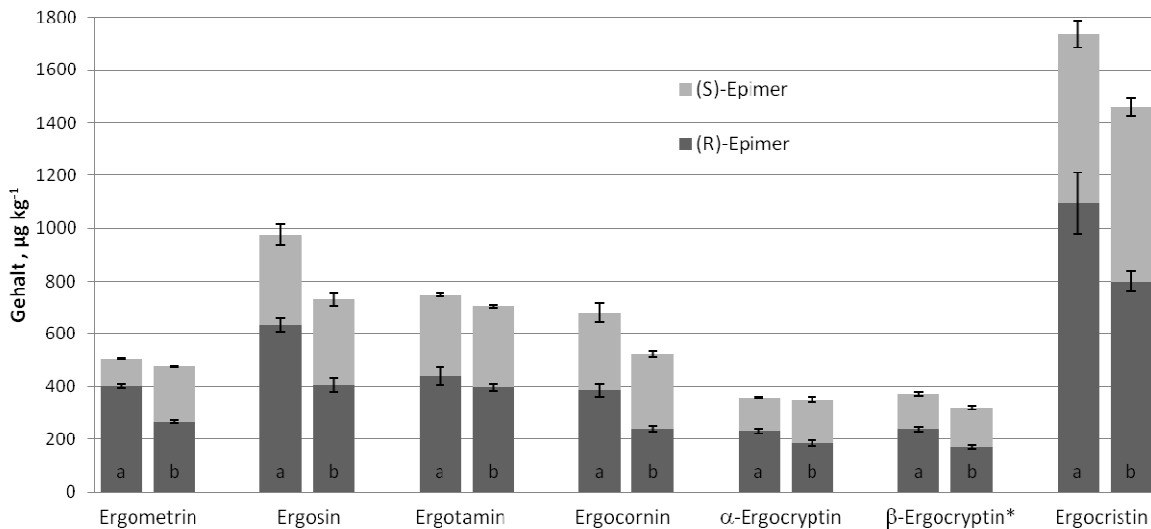


Abbildung 23: Ergotalkaloidgehalte (a) in Mehl und (b) in Brot.

Anhand der Brotmatrix konnten die bei der Keksmatrix erhaltenen Ergebnisse bestätigt werden - auch hier zeigte sich eine Detoxifizierung durch den Backprozess zum einen durch thermischen Abbau und zum anderen durch eine Verschiebung des Epimerenverhältnisses hin zum (S)-Epimer.

5.3.2 Epimerisierung/Abbau von Ergotalkaloiden im *in vitro* Verdaumodell

Zur Untersuchung der Fragestellung, wie sich Ergotalkaloide bezüglich ihres Abbaus und der Epimerisierung im Verdauungsprozess verhalten, kam ein *in vitro* Verdaumodell zum Einsatz. Dieses wurde auf Grundlage der Modelle von Oomen *et al.* [90] und der DIN 19738 [91] entwickelt, um den Verdau von ergotalkaloidhaltigen Matrices simulieren zu können. Da die beiden verwendeten Modelle verschiedene Zeiten für den Verdau im Darmtrakt vorsehen (zwei [90] bzw. sechs Stunden [91]) wurde zuerst der Einfluss der Verdauzeit im Darmtrakt untersucht (Abbildung 24).

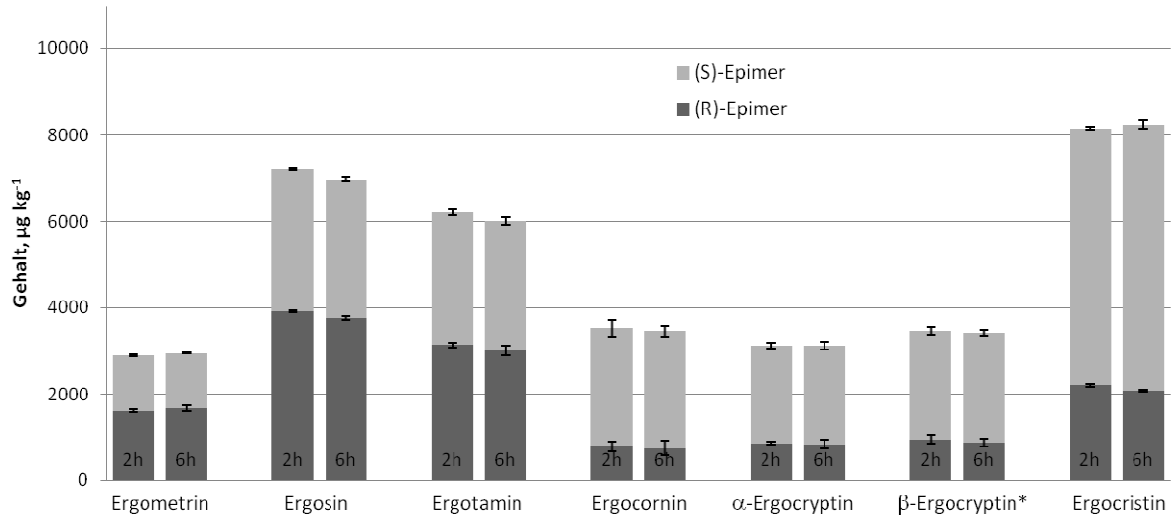


Abbildung 24: Ergotalkaloidgehalte der Kekse nach Verdau unter Variation der Verdauzeiten in der Darmlösung von 2 und 6 Stunden.

Da die Ergebnisse nicht signifikant voneinander verschieden sind (Zwei-Stichproben-t-Tests, Irrtumswahrscheinlichkeit 0,05), wurde für alle weiteren Experimente eine Verdauzeit im Darmtrakt von zwei Stunden gewählt. Das verwendete *in vitro* Verdaumodell ist in Abbildung 25 schematisch dargestellt.

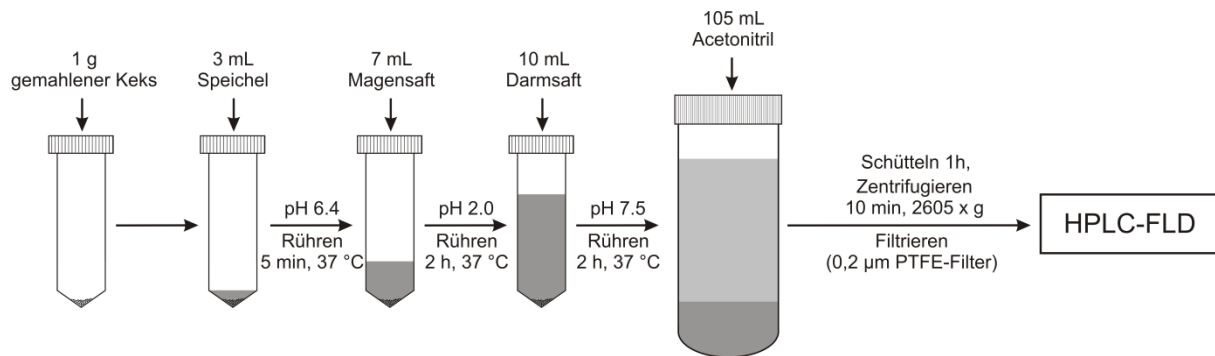
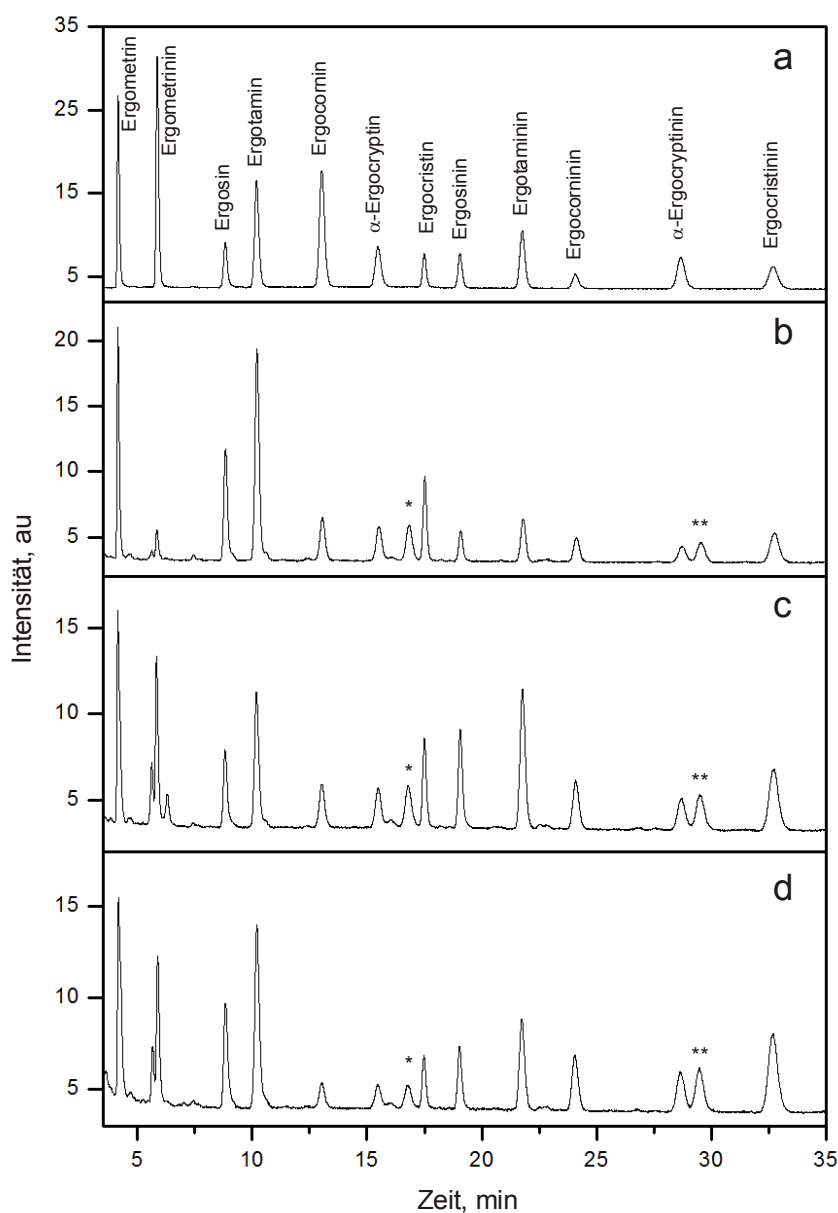


Abbildung 25: Schema des verwendeten *in vitro* Verdaumodells.

Das Verdaumodell wurde auf die gebackenen Kekse und Brote angewendet. Die Proben wurden in gemahlener Form eingesetzt (Abschnitt 4.2.4.2). Die Größe der Partikel wurde nicht überprüft, da schon nach der Inkubation in der Speichellösung (5 min) bei beiden Matrices keine Partikel mehr zu erkennen waren und sich eine emulsionsartige Lösung gebildet hatte. Daher wurde, auch zur Vermeidung thermischer Effekte auf die Matrices, auf eine weitere

Mahlung der Proben verzichtet. Zur Überprüfung von Einflüssen der Keks- bzw. Brot-Matrix auf den *in vitro* Verdauprozess wurden zusätzlich Standardlösungen verdaut.



*/** β -Ergocryptin(in)

Abbildung 26: FLD-Chromatogramme von (a) Mischung von 12 Ergotalkaloid-Standards mit $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ pro Verbindung, (b) mit Sklerotien dotiertes Roggenmehl (Gesamtergotalkaloidgehalt 42 mg kg^{-1}), (c) Keks aus mit Sklerotien dotiertem Roggenmehl (36 mg kg^{-1}) und (d) Keks nach *in vitro* Verdau (33 mg kg^{-1}).

Die instrumentelle Analyse der Extrakte des Mehls, der Kekse, der Brote und die verschiedenen Verdaulösungen wurde ohne weitere Probenvorbereitung durchgeführt, da die Matrixeinflüsse gering waren (Chromatogramme Abbildung 26). Trotz des Verzichtes auf ein Clean-up konnten niedrige BG zwischen 1,0 (Ergocornin) und $2,9 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Ergocorninin) erreicht werden [109].

5.3.2.1 Epimerisierung/Abbau von Ergotalkaloiden durch *in vitro* Verdau von Keksen

Der Abbau der Ergotalkaloide nach Verdau der Keksmatrix war gering und variierte bei den Keksen, die 13 min gebacken wurden zwischen $2,9 \pm 5,1 \%$ (α -Ergocryptin(in)) und $10,2 \pm 2,4 \%$ (Ergocornin(in)). Die Epimerisierung fiel für das einfache Lysergsäureamid Ergometrin(in) am kleinsten aus, wobei sich der Anteil von Ergometrin am Gesamt-Ergometrin(in) Gehalt um $3,9 \pm 1,9 \%$ in Richtung des (*R*)-Epimers verschob. Bei den Ergotalkaloiden der Ergotoxingruppe wurde eine starke Verschiebung des Epimerenverhältnisses in Richtung des biologisch inaktiven (*S*)-Epimers beobachtet. Im Gegensatz dazu konnte bei den Ergotalkaloiden der Ergotamin-Gruppe eine deutliche Epimerisierung auf die Seite der (*R*)-Epimere beobachtet werden (Ergosin $19,5 \pm 2,2 \%$, Ergotamin $19,0 \pm 2,5 \%$). Für diese beiden Ergotalkaloide führt der *in vitro* Verdau zu einer ansteigenden Toxizität [109].

Die Kekse mit einer Backzeit von 9 und 17 min wurden ebenfalls verdaut und zeigten nur einen geringen Ergotalkaloid-Abbau (Tabelle 10). Die Epimerisierung verlief für die Ergotoxin- und Ergotamin-Ergotalkaloide auch in jeweils unterschiedliche Richtungen (Abbildung 27). Das zeigt, dass die Backzeit und die daraus resultierenden unterschiedlichen Matrices die Richtung der Epimerisierung im *in vitro* Verdaumodell nicht beeinflussen.

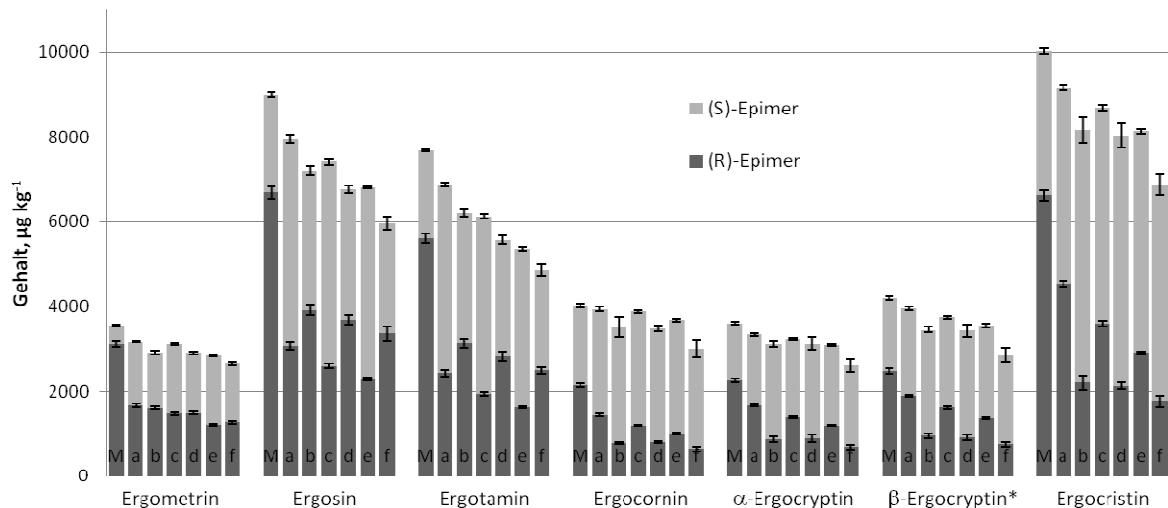


Abbildung 27: Ergotalkaloidgehalte (M) im Mehl, (a) in Keksen nach 9 min Backzeit und (b) nach Verdau, (c) nach 13 min Backzeit und (d) nach Verdau, (e) nach 17 min Backzeit und (f) nach Verdau.

5.3.2.2 Epimerisierung/Abbau von Ergotalkaloiden durch *in vitro* Verdau von Brot

Zur Überprüfung der durch den Verdau der Kekse erhaltenen Ergebnisse anhand einer zweiten Matrix wurde der *in vitro* Verdau an einem Brot, welches aus mit Sklerotien dotiertem Mehl gebacken wurde, durchgeführt. Wie bei dem Verdau der Keksmatrix wurde nur eine sehr geringe Epimerisierung bei Ergometrin(in) beobachtet (Tabelle 10). Die Ergotalkaloide der Ergotoxin-Gruppe zeigten eine Verschiebung des Epimerenverhältnisses auf die Seite der toxisch nicht relevanten (S)-Epimere, wogegen die Ergotamin-Ergotalkaloide eine Verschiebung auf die Seite der (R)-Epimere zeigten (Abbildung 28).

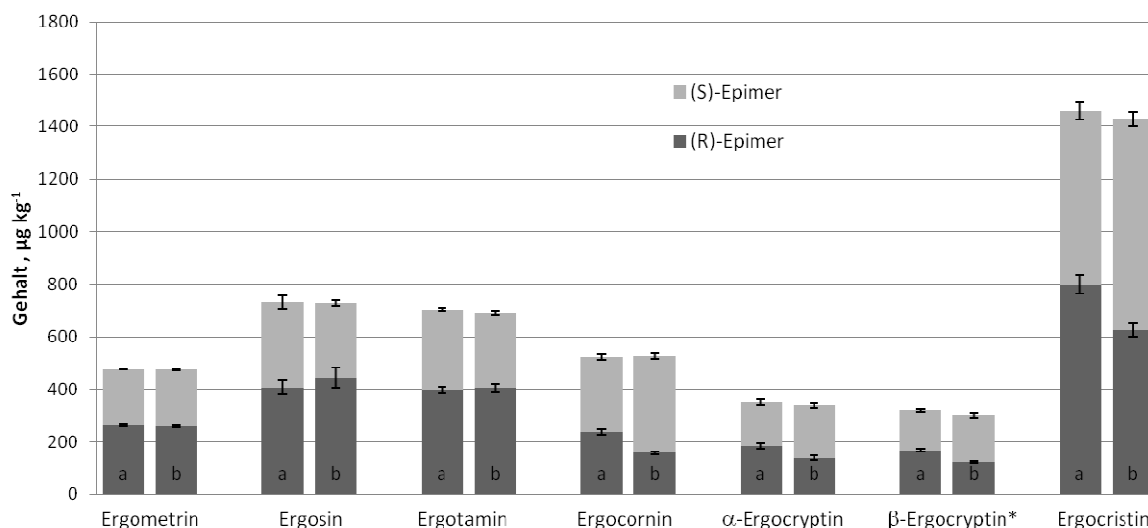


Abbildung 28: Ergotalkaloidgehalte in (a) Brot und (b) nach Verdau.

Die Ergebnisse aus dem *in vitro* Verdau der Brote bestätigen demnach die Ergebnisse aus der Verdausimulation der Kekse. Die Verschiebung des Epimerenverhältnisses der Ergotamin-Ergotalkaloide fiel bei dem Verdau der Brote mit $5,2 \pm 7,5$ (Ergosin(in)) und $2,1 \pm 3,7$ % (Ergotamin(in)) zwar deutlich geringer aus als bei dem Keksverdau ($19,5 \pm 2,2$ % Ergosin(in) und $19,0 \pm 2,5$ % Ergotamin(in)); die selektiv unterschiedliche Richtung für Ergotamin- und Ergotoxin-Ergotalkaloide zeigte sich dennoch deutlich. Somit konnte eine Toxifizierung der Ergotamin-Ergotalkaloide bei zwei verschiedenen Backwaren nach *in vitro* Verdau gezeigt werden.

5.3.2.3 Epimerisierung/Abbau von Ergotalkaloid-Standardsubstanzen durch *in vitro* Verdau

Zur Untersuchung der Matrixabhängigkeit der Epimerisierung wurden reine Standardsubstanzen ohne die Zugabe einer Backwaren-Matrix im *in vitro* Modell verdaut. Auch hier wurde nur eine minimale Epimerisierung bei Ergometrin(in) beobachtet. Bei den Ergotoxin-Ergotalkaloiden kam es zu einer Verschiebung des Epimerenverhältnisses auf die Seite der (S)-Epimere in einem geringeren Ausmaß als in den bereits beschriebenen Experimenten mit Matrixeinfluss (Abbildung 29, Tabelle 10). Die Toxifizierung der Ergotamin-Ergotalkaloide durch den *in vitro* Verdau konnte durch den Verdau der Standardsubstanzen bestätigt werden.

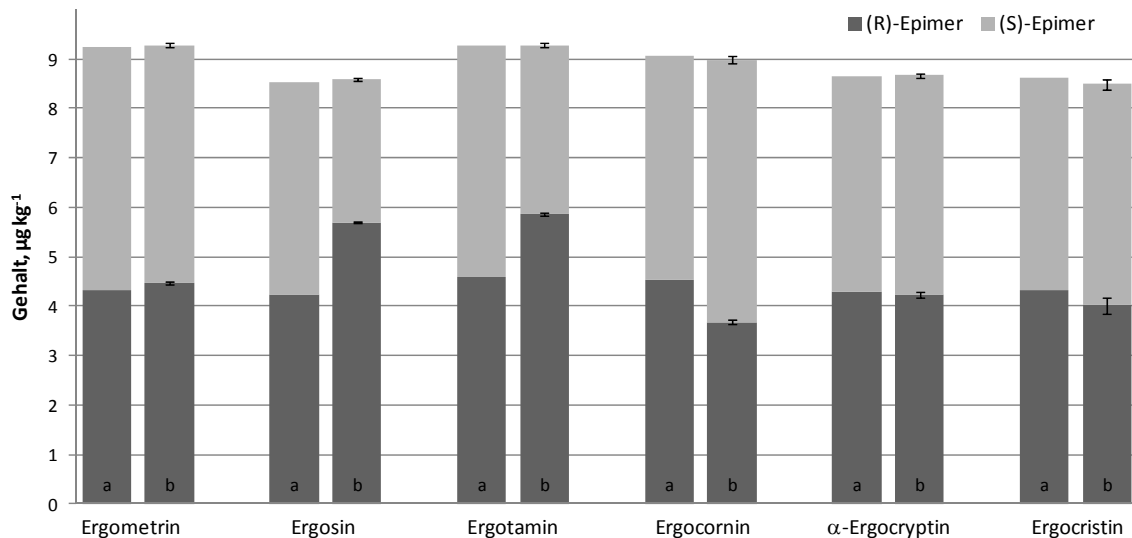


Abbildung 29: Ergotalkaloidgehalt der (a) Standardlösung und (b) nach Verdau.

Die Ergebnisse des Verdaus der Standardsubstanzen zeigen zudem, dass die Toxifizierung der Ergotamin-Ergotalkaloide nach *in vitro* Verdau nicht durch Substanzen aus der Brot- oder Kekse-Matrix hervorgerufen wird, sondern dass die beobachteten Effekte matrixunabhängig sind und sich auf andere ergotalkaloidhaltige Lebensmittel übertragen lassen. Der Grad der Verschiebung des Epimerenverhältnisses kann matrixabhängig sein, da bei den beiden untersuchten Matrices und dem *in vitro* Verdauexperiment ohne Matrix die Effekte unterschiedlich stark ausgeprägt waren. Diese Effekte können durch verschiedene Salze, die aus unterschiedlichen Matrices herausgelöst wurden und die Zusammensetzung der Salze in den synthetischen Verdauungen verändern, hervorgerufen werden. Welches Salz dabei zu einer Beschleunigung oder Inhibierung der Epimerisierungsrate oder zu einer Verschiebung des Epimerengleichgewichtes führt, lässt sich aufgrund vorhandener Daten nicht vorhersagen.

5.3.2.4 Epimerisierung/Abbau von Ergotalkaloiden in synthetischem Speichel und Magensaft

Die Ergebnisse aus dem *in vitro* Verdau der Kekse hatten gezeigt, dass die Richtung der Verschiebung des Epimerenverhältnisses unabhängig von der Backzeit ist. Aus diesem Grund wurden für die unter 5.3.2.4 und 5.3.2.5 durchgeführten Experimente nur die 13 min gebackenen Kekse verwendet. Die 13 min gebackenen Kekse waren zudem von der Konsistenz her kommerziell erhältlichen Keksen am ähnlichsten.

Zur Identifizierung der Stufe des *in vitro* Verdaus, in welcher die selektiv unterschiedliche Epimerisierung der Ergotoxin- und Ergotamin-Ergotalkaloide stattfindet, wurden die Kekse nur in Speichel und in Speichel + Magensaft inkubiert. In diesen beiden Schritten des *in vitro* Verdaumodells wurde keine selektive Epimerisierung beobachtet. Im Speichel erfolgte kein bzw. nur ein geringer Abbau und bis auf Ergometrin(in), wo es zu einer geringen Verschiebung des Epimerenverhältnisses auf die Seite des (*R*)-Epimers kam (2 %), wurde bei allen anderen Ergotalkaloiden eine minimale Verschiebung des Epimerenverhältnisses auf die Seite der (*S*)-Epimere beobachtet (Abbildung 30).

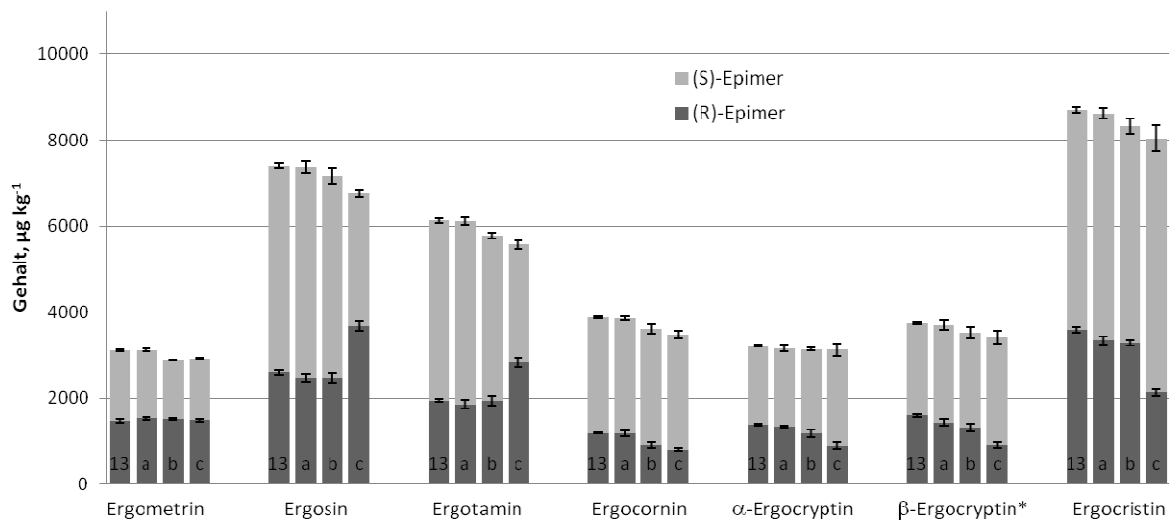


Abbildung 30: Ergotalkaloidgehalt in Keksen mit einer Backzeit von 13 min, nach *in vitro* Verdau in (a) Speichel, (b) Speichel und Magensaft, (c) Speichel, Magensaft und Darmsaft.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass α -Amylase (Enzym) und Mucin (organische Verbindung in der synthetischen Speichellösung, (Tabelle 9)) nicht verantwortlich sind für die unterschiedliche Epimerisierung von Ergotoxin- und Ergotamin-Ergotalkaloiden. Im Vergleich dazu führte der Verdau in Speichel und Magensaft zu einem stärkeren Abbau (zwischen 2 und 8 %). Jedoch zeigte sich auch in dieser Stufe des Verdaus keine selektive Epimerisierung von Ergotoxin- und Ergotamin-Ergotalkaloiden (Abbildung 30). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass auch Pepsin (Enzym in der synthetischen Magenlösung (Tabelle 9)) keine entscheidende Rolle in dem zuvor beschriebenen unterschiedlichen Epimerisierungsverhalten spielt. Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass die selektive Epimerisierung weder im Speichel noch im Magensaft des Verdaumodells stattfindet und folglich durch die Darmlösung hervorgerufen werden muss.

5.3.2.5 Einfluss von Darmenzymen auf die Epimerisierung von Ergotalkaloiden

Da die selektiv unterschiedliche Epimerisierung zwischen Ergotamin- und Ergotoxin-Ergotalkaloiden in vorangegangenen Experimenten nur nach Verdau in allen drei Stufen, das heißt nach Verdau in Speichel, Magen und Darm, stattfand, wurde zuerst überprüft, ob dieser selektive Effekt auch bei einer Verdausimulation nur im Darmteil beobachtet wird. Da der Darmsaft des verwendeten *in vitro* Verdaumodells drei verschiedene enzymatische Zusätze (Galle, Trypsin, Pankreatin) enthält, wurden Verdausimulationen durchgeführt, bei welchen die Zusammensetzung des Darmsaftes systematisch variiert wurde. Wie in Abbildung 31 gezeigt ist, wurde der Darmverdau mit allen Zusätzen (a), nur mit Galle (b), nur mit Trypsin (c) und nur mit Pankreatin (d) durchgeführt.

Für Ergotoxin-Ergotalkaloide spielte es keine Rolle, ob alle oder jeweils nur Pankreatin, Trypsin oder Galle hinzugegeben wurden - es erfolgte immer eine Epimerisierung in Richtung des toxikologisch nicht relevanten (*S*)-Epimers. Bei Ergometrin wurde ein Anstieg des anfänglichen Verhältnisses von Ergometrin am Gesamt-Ergometrin(in) Gehalt von (a) 7, (b) 9, (c) 9 und (d) 7 % beobachtet (Abbildung 31).

Bei den Ergotamin-Ergotalkaloiden kam es zu einer deutlichen Verschiebung des Epimerenverhältnisses auf die Seite der (*R*)-Epimere bei Verwendung von allen Zusätzen, nur Galle und nur Pankreatin, mit einem jeweiligen Anstieg des ursprünglichen Ergotamin-Ergotalkaloidgehaltes am Gesamt-Ergotamin(in)-Gehalt von 20 (Ergosin) und 17 % (Ergotamin). Im Gegensatz dazu führte der Darmverdau mit Trypsin nur zu einem Anstieg von 11 (Ergosin) und 9 % (Ergotamin).

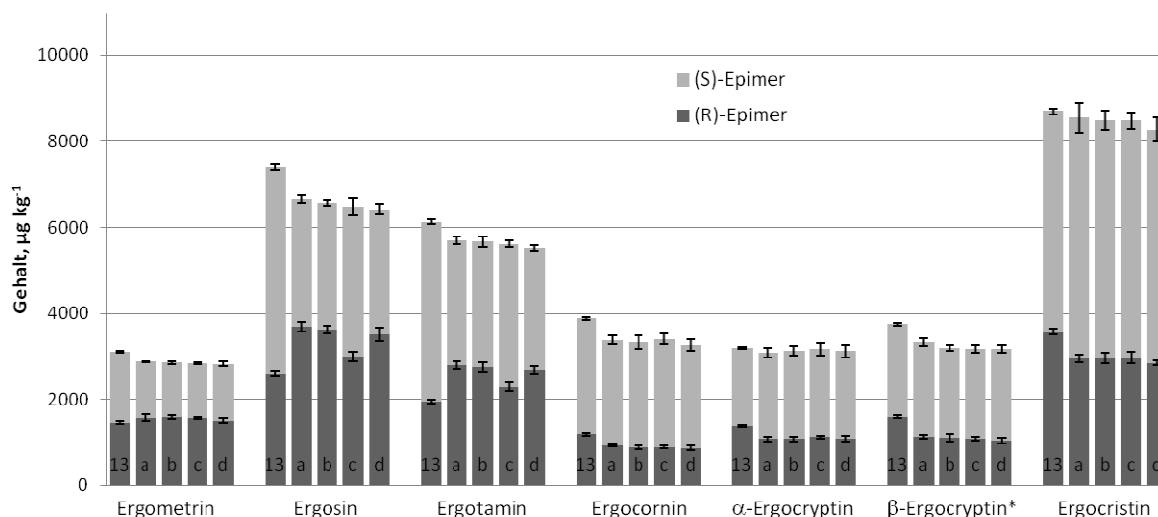


Abbildung 31: Ergotalkaloidgehalt in (13) Keksen, nach Darmverdau mit (a) allen Enzymen, (b) nur mit Galle, (c) nur mit Trypsin und (d) nur mit Pankreatin.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die selektiv unterschiedliche Epimerisierung von Ergotamin- und Ergotoxin-Ergotalkaloiden nur im Darm stattfindet und es dabei keine Rolle spielt, ob die Ergotalkaloide zuvor in Speichel und Magen inkubiert wurden oder nicht. Im Darm kommt es in Gegenwart der für den Fettverdau wichtigen Gemische Galle und Pankreatin zu einer deutlichen Toxifizierung der Ergotalkaloide aus der Ergotamin-Gruppe. Hierfür könnten ein oder mehrere Enzyme verantwortlich sein, die in beiden Gemischen (Galle und Pankreatin) vorhanden sind. Möglich ist, dass diese Enzyme aufgrund struktureller Merkmale der Ergotamin-Ergotalkaloide nur mit diesen wechselwirken (Abbildung 3, $R_1 = \text{Methyl}$) und so zu der selektiven Epimerisierung führen. Im Vergleich dazu hat die Serinprotease Trypsin einen geringeren Effekt.

5.4 Untersuchung von Ergotalkaloid-Konjugaten

Ergotalkaloide unterliegen vielen verschiedenen Abbaureaktionen während der Lagerung und bei Verarbeitungsprozessen, wobei eine dieser Reaktionen die Addition von Wasser an die C9-C10-Doppelbindung im Ergolin-Grundgerüst aller Ergotalkaloide darstellt. Da diese Reaktion nur unter UV-Licht stattfindet, wurden die bei der Reaktion entstehenden Verbindungen von Stoll und Schlientz 1955 als Lumi-Ergotalkaloide bezeichnet [30]. Durch die Addition von Wasser an die C9-C10-Doppelbindung entsteht ein neues Stereozentrum an der C10-Position,

wodurch aus einem Ergotalkaloid zwei verschiedene Lumi-Ergotalkaloide gebildet werden (Abbildung 6). Zur Untersuchung dieser Reaktion wurde exemplarisch das Ergotalkaloid Ergometrin gewählt, da es zu den sechs prioritären Ergotalkaloiden zählt. Neben Wasser ist auch die lichtinduzierte Addition anderer nukleophiler Substanzen an das Ergolin-Grundgerüst denkbar. So ist es möglich, dass die in Sklerotien vorhandenen Fettsäuren unter Einfluss von Licht an die C9-C10-Doppelbindung von Ergotalkaloiden addiert werden und somit bisher unbekannte Ergotalkaloid-Abbauprodukte entstehen.

5.4.1 Lumi-Ergometrin

Die Addition von Wasser an die C9-C10-Doppelbindung erfolgt regioselektiv, so dass die OH-Gruppe sich im Lumi-Ergometrin (LEM) an der C10-Position befindet. Dieses lässt sich über den Reaktionsmechanismus erklären, wobei ein Carbenium-Ion am tertiären Kohlenstoff C10 entsteht [10]. Der Mechanismus der Reaktion ist in Abbildung 6 im Abschnitt 2.2 dargestellt.

5.4.1.1 Strukturelle Identifizierung

Das Hauptprodukt, welches bei der Reaktion von Ergometrin mit Wasser unter UV-Licht entsteht, wurde isoliert. Mit Hilfe der Einkristallröntgenstrukturanalyse konnte eine eindeutige Zuordnung der Konfiguration von LEM an der C10-Position getroffen werden. Das Hauptprodukt der Reaktion ist das 10-(*S*)-konfigurierte LEM [110] (Abbildung 32), welches in einem Verhältnis von 65 zu 1 % entsteht [33].

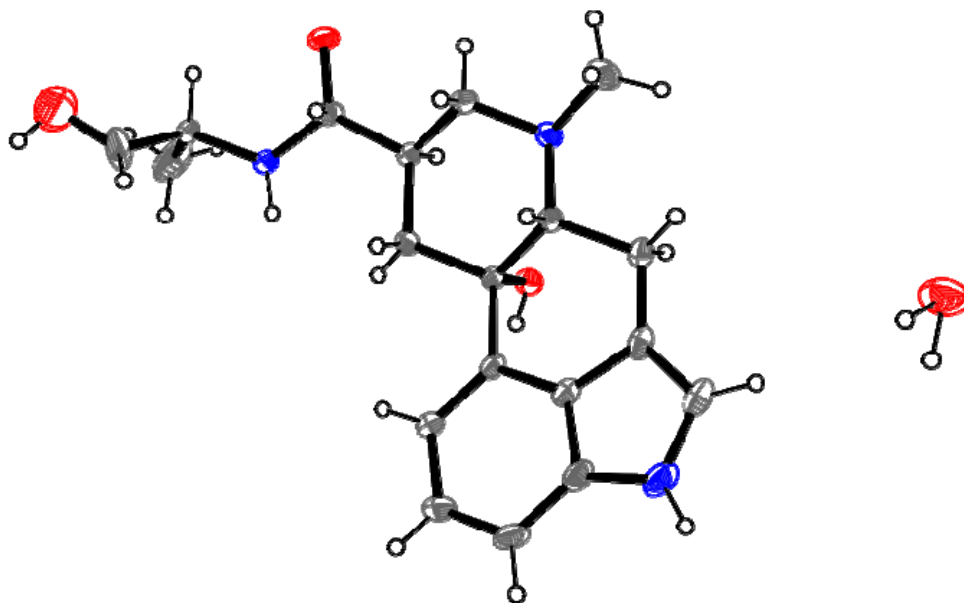


Abbildung 32: Kristallstruktur von 10-(*S*)-LEM [110].

Eine Erklärung für die Stereoselektivität der Reaktion liefert die Kristallstruktur des Eduktes der Reaktion (Ergometrin-Maleat). Das Maleat-Ion wird hier über das N6-Atom auf der Si-Seite des Ergometrins koordiniert (Abbildung 33a), womit in wässriger Lösung an der Si-Seite auch Wasser zur stereoselektiven Addition koordiniert werden kann.

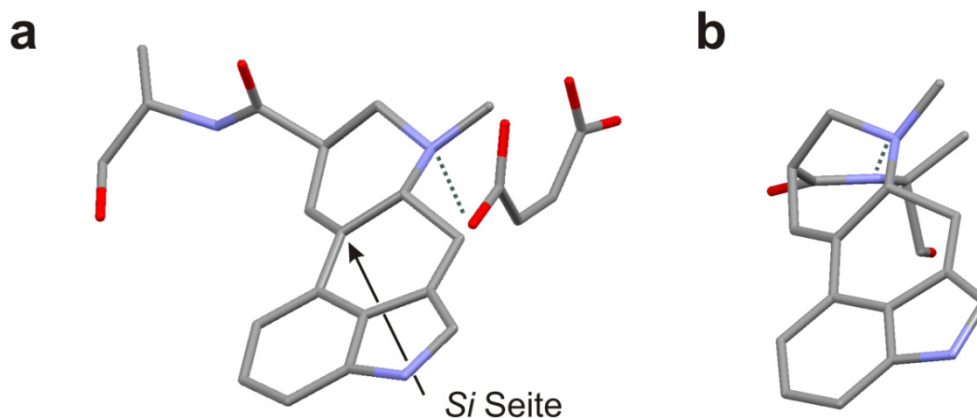


Abbildung 33: Kristallstrukturen von (a) Ergometrin-Maleat [71] und (b) Ergometrinin [97].

Dieser Mechanismus wird dadurch bekräftigt, dass in dem C8-(*S*)-Epimer Ergometrinin keine Koordination von Solvent (Abbildung 33b) durch eine intramolekulare N_{Amid}-H-N6-Wasserstoffbrücke möglich ist [97]. Dadurch wird das Wassermolekül nicht an einer bestimm-

ten Seite koordiniert. Das erklärt die von Hellberg [32] berichtete ausgeglichene Verteilung der beiden Lumi-Ergometrinin Isomere, mit 20 % ((*S*)-Lumi-Ergometrinin) und 37 % ((*R*)-Lumi-Ergometrinin).

5.4.1.2 Nachweis von Lumi-Ergometrin in Sklerotien

Zum Nachweis von LEM in Sklerotien wurde eine HPLC-MS/MS-Methode entwickelt. Die analytspezifischen MS-Parameter wurden mittels Spritzenpumpeninfusion in das HPLC-MS/MS-System unter Verwendung der Analyst-Software 1.5 optimiert. Die drei intensivsten Produkt-Ionen sind in Tabelle 29 dargestellt. Das Molekül-Ion von Ergometrin zeigte die höchste Intensität, hatte aber im Vergleich zu den anderen Produkt-Ionen ein deutlich schlechteres Signal/Rausch-Verhältnis. Die zweit- und dritt-intensivsten Produkt-Ionen bestanden aus dem Ergolin-Grundgerüst und sind damit ergotalkaloidtypisch [111].

Tabelle 29: Optimierte MS/MS-Parameter der drei intensivsten Produkt-Ionen $[M+H]^+$ von 10-(*S*)-LEM $[M+H]^+$ ($m/z = 344,05$).

Produkt-Ion [m/z]	Declustering Potential [V]	Collision Energy [V]	Collision Cell Exit Potential [V]	Dwell Time [ms]	Zuordnung
326,2	46	19	8	50	m/z 344 minus H_2O
223,2	46	37	16	50	m/z 326 minus (Peptid-Seitenkette $C=O-NH_2$)
208,1	46	45	55	50	m/z 223 minus CH_3

Nach der Optimierung der MS/MS-Parameter wurde eine HPLC-MS/MS-Methode zum Nachweis von LEM in Sklerotien entwickelt.

Das HPLC-DAD Chromatogramm ($\lambda = 224$ nm) des Syntheseprodukts von Ergometrin nach Bestrahlung ($\lambda = 350$ nm, Spektrum Abbildung 8) in essigsaurer Lösung zeigte nur die beiden LEM-Epimere (Abbildung 34). Nach einer Bestrahlungszeit von 8,5 Stunden konnten weder Ergometrin noch Ergometrinin detektiert werden. Da keine Epimerisierung von Ergometrin zu Ergometrinin beobachtet werden konnte, obwohl diese Reaktion unter sauren Bedingungen beschleunigt verläuft [10], ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Bildungsreaktion von LEM viel schneller als die Epimerisierung an der C8-Position von Ergometrin.

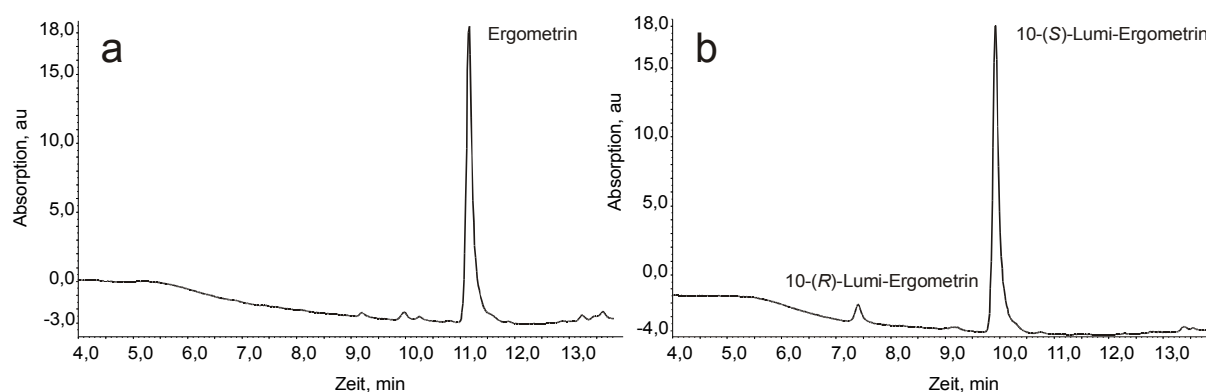


Abbildung 34: HPLC-DAD-Chromatogramme ($\lambda = 224$ nm) von (a) Ergometrin-Maleat und (b) Ergometrin-Maleat nach 8,5 Stunden Bestrahlung bei $\lambda = 350$ nm in essigsaurer Lösung.

Das MRM Chromatogramm des Syntheseprodukts zeigt, dass 8-(*R*),10-(*S*)-LEM vorrangig gebildet wird (Abbildung 35). In Sklerotienproben konnten beide LEM-Isomere nachgewiesen werden. Im Vergleich zum Syntheseprodukt ist das Verhältnis von 10-(*S*)-LEM und 10-(*R*)-LEM in Matrixproben auf die Seite des 10-(*R*)-LEM verschoben (Abbildung 35). Dieser Effekt kann durch eine Epimerisierung von Lumi-Ergometrinin erklärt werden, ist jedoch unwahrscheinlich, da die Epimerisierung am C8-Atom bei Ergotalkaloiden mit einer C9-C10-Einfachbindung sehr langsam verläuft [32]. Die Verschiebung des genannten Verhältnisses in Realproben kann vielmehr mit den unterschiedlichen Reaktionsbedingungen zwischen Matrix und Laborsynthese (pH-Wert, Matrix-Effekte) erklärt werden.

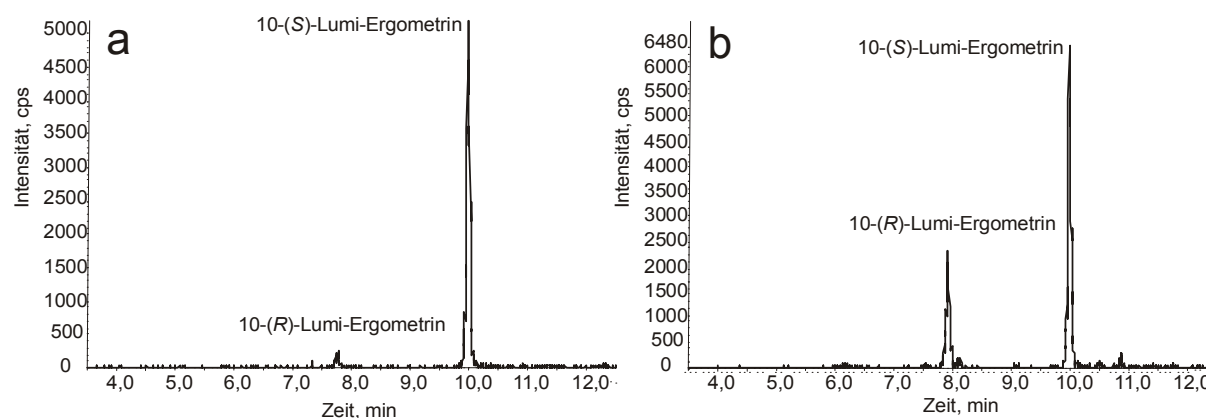


Abbildung 35: MRM-Chromatogramme (m/z 344,05 \rightarrow 223,2) von (a) Ergometrin-Maleat nach 8,5 Stunden Bestrahlung bei $\lambda = 350$ nm in wässriger essigsaurer Lösung und (b) einem Sklerotienextrakt (Probe Nr. 1, Tabelle 30).

Um auszuschließen, dass sich LEM während der Probenvorbereitung bildet, wurde eine Blindprobe, welche nur Ergometrin-Maleat enthielt, analog zu den Matrixproben aufgearbeitet. In dieser Probe konnte kein LEM detektiert werden. In allen analysierten Sklerotienproben wurde LEM nachgewiesen (Tabelle 30). Da die Sklerotien der Proben 1 - 6 in Dunkelheit gelagert wurden, muss die Bildung von LEM auf dem Feld oder bei/nach der Ernte erfolgt sein. Von Silber und Bischoff [112] wurde berichtet, dass sich die Ergotalkaloide am äußeren Rand der Sklerotien konzentrieren und der Gehalt nach innen hin abnimmt. Dadurch kann LEM vor allem an der Oberfläche in Verbindung mit der Sonneneinstrahlung gebildet werden. Es ist somit das erste Mal, dass Lumi-Ergotalkaloide in natürlich gewachsenen Proben nachgewiesen werden konnten. Da für die Bildung von Lumi-Ergotalkaloiden Wasser benötigt wird, wurde der Feuchtegehalt in Sklerotien bestimmt. Dieser lag mit $4,54 \pm 0,05 \%$ deutlich niedriger als in einer zum Vergleich gemessenen Roggenmehlprobe ($11,63 \pm 0,03 \%$) und ist damit aber dennoch hoch genug zur Bildung von LEM. Die mindestens 20 Jahre alte Sklerotienprobe hatte das höchste Verhältnis zwischen LEM und Ergometrin (Tabelle 30). Dieses zeigt, dass sich einerseits der Abbauprozess von Ergometrin zu LEM über Jahre vollzieht und andererseits der Umwandlungsprozess begrenzt ist, da LEM nur an der Oberfläche gebildet wird. Da LEM in einer so alten Probe gefunden werden konnte, stellt dieses ein stabiles Abbauprodukt von Ergometrin dar. Obwohl die Quantifizierung von LEM in Ermangelung eines ausreichend charakterisierten Standards nicht möglich war, kann ausgehend von dem Verhältnis der Peakflächen von LEM und Ergometrin vermutet werden, dass der LEM-Gehalt deutlich geringer war als der von Ergometrin.

Tabelle 30: Peakflächen von 10-(S)-LEM (m/z 344,05→223,2) und Ergometrin (m/z 326,2→223,2) verschiedener Sklerotienextrakte.

Proben-Nr.	Jahr der Probennahme	10-(S)-LEM Peakfläche ^a , [cps × 10 ⁻³]	Ergometrin Peakfläche ^a , [cps × 10 ⁻³]	Verhältnis Peakfläche 10-(S)-LEM/Ergometrin
1	2009	269	13252	0,020
2	2008	160	11739	0,014
3	2008	92	7894	0,012
4	2008	264	11121	0,024
5	2008	22	1219	0,018
6	2008	305	11552	0,026
7	vor mind. 20 Jahren	555	15721	0,035

^a Peakfläche gewichtet mit Proben- und Lösungsmittelmenge

Damit ist erstmals gelungen, die Struktur von 10-(*S*)-LEM, dem Hauptprodukt der photochemischen Reaktion von Ergometrin-Maleat und Wasser, zu beschreiben. Eine HPLC-MS/MS-Methode zum Nachweis von LEM wurde entwickelt, womit LEM in Sklerotien, das heißt in einer realen Matrix, nachgewiesen werden konnte. Das Vorhandensein von LEM in dunkel gelagerten Sklerotien zeigt, dass der Abbauprozess bereits auf dem Feld bzw. nach der Ernte bei der Lagerung in Gegenwart von Licht begonnen hat. Diese Ergebnisse verdeutlichen zudem, dass der Abbau von Ergotalkaloiden in Gegenwart von Licht auch eine Rolle für die Ergotalkaloid-Analytik spielt. Die Bildung von Lumi-Ergotalkaloiden stellt einen der Hauptabbauwege von Ergotalkaloiden in natürlicher Umgebung dar. Da bisher keine Daten über den Gehalt von Lumi-Ergotalkaloiden in Lebensmitteln verfügbar sind, ist eine zukünftige Quantifizierung des Lumi-Ergotalkaloidgehaltes in Lebensmitteln zur Schaffung einer Datenbasis sinnvoll. Zusätzlich verdienen die Lumi-Ergotalkaloide vor dem Hintergrund der toxikologischen Wirksamkeit von LEM [31] besondere Aufmerksamkeit.

5.4.2 Ergotalkaloid-Fettsäure-Konjugate

Neben Wasser können auch andere nukleophile Substanzen an die C9-C10-Doppelbindung angelagert werden. Wie bei den Lumi-Ergotalkaloiden entstehen durch die Anlagerung von Molekülen an die Doppelbindung Substanzen mit veränderten Eigenschaften. Im Gegensatz zur Anlagerung von Wasser entstehen jedoch bei der Anlagerung von Fettsäuren deutlich unpolarere Substanzen verglichen mit den jeweiligen Ergotalkaloiden.

5.4.2.1 Synthese und Charakterisierung von Ergotalkaloid-Fettsäure-Konjugaten

Durch den hohen Fett-/Ölanteil (ca. 30 % [113]) in Sklerotien ist das natürliche Vorkommen von Ergotalkaloid-Fettsäure-Konjugaten möglich. Zur Synthese solcher Verbindungen wurden exemplarisch die Fettsäuren Linolsäure **35** und Ricinolsäure **34** verwendet (Abbildung 36), da diese mit jeweils 9,8-17,4 % und 24,1-35,5 % den Hauptbestandteil von Sklerotien-Öl darstellen [113,114].

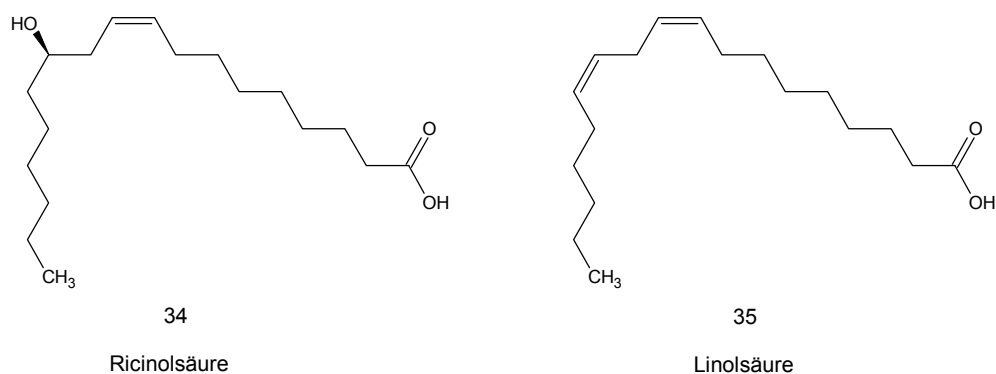


Abbildung 36: Strukturen von Ricinol- **29** und Linolsäure **30**.

Die aus der photochemischen Synthese ($\lambda = 350$ nm, $t = 3,5$ Stunden) erhaltenen Verbindungen (Ergotamin-, Ergocornin- und α -Ergocryptin-Ricinolsäure- bzw. Linolsäure-Konjugate) wurden mittels präparativer HPLC aufgereinigt (Tabelle 11). Mit Hilfe von MS/MS-Experimenten konnte eine strukturelle Identifizierung der Verbindungen vorgenommen werden. Die durch Fragmentierung in der MS/MS erhaltenen Produkt-Ionen wurden alle zugeordnet (Tabelle 31) und entsprachen den jeweiligen Ergotalkaloiden selbst bzw. waren ergotalkaloidtypische Fragmente [111]. In der Synthese entstand, analog zu der Synthese von LEM [110], bei allen sechs Fettsäure-Konjugaten ein Hauptprodukt, welches isoliert wurde. Da bei der Synthese nur eine Verbindung in isolierbarer Menge entstand, wird angenommen, dass sich der Fettsäureester analog zu der OH-Gruppe der Lumi-Ergotalkaloide [30,32,33] regioselektiv an der C10-Position befindet und an dieser Stelle (*S*)-konfiguriert ist.

Tabelle 31: Molekülionen $[M+H]^+$, die fünf intensivsten Produkt-Ionen $[M+H]^+$ und Zuordnung der Produkt-Ionen [111] der synthetisierten Ergotalkaloid-Fettsäureverbindungen.

Verbindung	Summenformel	m/z		Zuordnung
		Molekülion	Produkt-Ion	
Ergotamin-Ricinolsäure	$C_{51}H_{69}N_5O_8$	880,5	582,1	m/z 881 minus Ricinolsäure
			564,0	m/z 582 minus H_2O
			320,0	m/z 582 minus Spaltung im und Verlust eines Großteils des Peptidrings (im Amid und am Ether), Methylgruppe bleibt im Molekül
			223,1	m/z 582 minus (Peptid-Seitenkette $C=O-NH_2$)
			208,2	m/z 223 minus CH_3
Ergocornin-Ricinolsäure	$C_{49}H_{73}N_5O_8$	860,5	562,2	m/z 861 minus Ricinolsäure
			544,3	m/z 562 minus H_2O
			348,1	m/z 562 minus Spaltung im und Verlust eines Großteils des Peptidrings (im Amid und am Ether), Isopropylgruppe bleibt im Molekül
			277,0	m/z 562 minus Lysergsäure-Ringsystem vom Dehydrat des Peptidrings
			223,3	m/z 562 minus (Peptid-Seitenkette $C=O-NH_2$)
α -Ergocryptin-Ricinolsäure	$C_{50}H_{75}N_5O_8$	874,6	576,2	m/z 875 minus Ricinolsäure
			558,4	m/z 576 minus H_2O
			348,1	m/z 576 minus Spaltung im und Verlust eines Großteils des Peptidrings (im Amid und am Ether), Isopropylgruppe bleibt im Molekül
			291,2	m/z 576 minus Lysergsäure-Ringsystem vom Dehydrat des Peptidrings
			223,2	m/z 576 minus (Peptid-Seitenkette $C=O-NH_2$)
Ergotamin-Linolsäure	$C_{51}H_{67}N_5O_7$	862,5	582,3	m/z 862 minus Linolsäure
			564,1	m/z 582 minus H_2O
			320,2	m/z 582 minus Spaltung im und Verlust eines Großteils des Peptidrings (im Amid und am Ether), Methylgruppe bleibt im Molekül
			223,2	m/z 582 minus (Peptid-Seitenkette $C=O-NH_2$)
			207,9	m/z 223 minus CH_3

Verbindung	Summenformel	<i>m/z</i>		Zuordnung
		Molekülion	Produkt-Ion	
Ergocornin-Linolsäure	C ₄₉ H ₇₁ N ₅ O ₇	842,2	562,4	<i>m/z</i> 842 minus Linolsäure
			544,3	<i>m/z</i> 562 minus H ₂ O
			348,0	<i>m/z</i> 562 minus Spaltung im und Verlust eines Großteils des Peptidrings (im Amid und am Ether), Isopropylgruppe bleibt im Molekül
			223,4	<i>m/z</i> 562 minus (Peptid-Seitenkette C=O-NH ₂)
			208,1	<i>m/z</i> 223 minus CH ₃
α-Ergocryptin-Linolsäure	C ₅₀ H ₇₃ N ₅ O ₇	856,5	576,3	<i>m/z</i> 857 minus Linolsäure
			558,2	<i>m/z</i> 576 minus H ₂ O
			348,2	<i>m/z</i> 576 minus Spaltung im und Verlust eines Großteils des Peptidrings (im Amid und am Ether), Isopropylgruppe bleibt im Molekül
			223,3	<i>m/z</i> 576 minus (Peptid-Seitenkette C=O-NH ₂)
			208,2	<i>m/z</i> 223 minus CH ₃

Zur Bestimmung der exakten Massen der synthetisierten Verbindungen wurde ein hochauflösendes MS (Orbitrap) verwendet. Die Orbitrap bietet neben ihrer guten Auflösung von 100000 auch eine sehr hohe Massengenauigkeit. Die exakten und berechneten Massen sind in Tabelle 32 dargestellt und zeigen mit Abweichungen bis maximal 0,5 mDa eine sehr gute Übereinstimmung.

Tabelle 32: Vergleich der *m/z* der [M+H]⁺ der berechneten und der gemessenen Massen der Ergotalkaloid-Fettsäure-Konjugate.

Substanz	Summenformel	Orbitrap, <i>m/z</i> in Da	Berechnete Masse, <i>m/z</i> in Da	Fehler [mDa]
Ergotamin-Ricinolsäure	C ₅₁ H ₆₉ N ₅ O ₈	880,5215	880,5219	0,4
Ergocornin-Ricinolsäure	C ₄₉ H ₇₃ N ₅ O ₈	860,5527	860,5532	0,5
α-Ergocryptin-Ricinolsäure	C ₅₀ H ₇₅ N ₅ O ₈	874,5688	874,5688	0,0
Ergotamin-Linolsäure	C ₅₁ H ₆₇ N ₅ O ₇	862,5111	862,5113	0,2
Ergocornin-Linolsäure	C ₄₉ H ₇₁ N ₅ O ₇	842,5423	842,5426	0,3
α-Ergocryptin-Linolsäure	C ₅₀ H ₇₃ N ₅ O ₇	856,5582	856,5583	0,1

5.4.2.2 Nachweis der Ergotalkaloid-Fettsäure-Konjugate in Sklerotien

Zum Nachweis der Ergotalkaloid-Fettsäure-Konjugate in Sklerotien wurde eine HPLC-MS/MS-Methode entwickelt. Die analytischspezifischen Parameter wurden über Spritzenpumpeninjektionen der aufgereinigten synthetisierten Verbindungen in das HPLC-MS/MS-System mit Hilfe der Analyst 1.5 Software optimiert. Die erhaltenen Daten für die drei intensivsten Fragmentationen sind in Tabelle 33 dargestellt.

Tabelle 33: Massenübergänge der drei intensivsten Fragmentationen der synthetisierten Ergotalkaloid-Fettsäure-Konjugate (m/z) mit den optimierten MS/MS-Parametern nach Spritzenpumpenoptimierung.

Produkt-Ion [m/z]	Declustering Potential [V]	Collision Energy [V]	Collision Cell Exit Potential [V]
Ergotamin-Ricinolsäure (m/z 880,458)			
582,251	31	11	16
564,240	31	37	14
223,140	31	79	12
Ergocornin-Ricinolsäure (m/z 860,499)			
562,256	26	15	14
544,221	26	53	14
223,181	26	89	8
α -Ergocryptin-Ricinolsäure (m/z 874,578)			
576,234	31	17	16
558,225	31	31	14
348,150	31	53	6
Ergotamin-Linolsäure (m/z 862,521)			
582,357	56	11	16
564,140	56	35	14
223,205	56	71	18
Ergocornin-Linolsäure (m/z 842,218)			
562,347	41	15	16
544,243	41	31	10
223,192	41	73	2
α -Ergocryptin-Linolsäure (m/z 856,517)			
576,295	66	11	26
558,241	66	33	6
348,232	66	47	18

Das intensivste Fragment war immer das Molekülion des eigentlichen Ergotalkaloids. Alle anderen Fragmentationen sind ergotalkaloid-typisch, die Zuordnung wurde analog zu Lehner *et al.* [111] durchgeführt und ist in Tabelle 31 abgebildet. Der Nachweis in den analysierten Proben erfolgte über die beiden intensivsten Fragmentationen (Molekülion minus Fettsäure und

Molekülion minus Fettsäure, minus Wasser) und über die Retentionszeit. Die chromatographische Trennung aller synthetisierten Standardsubstanzen ist in Abbildung 37 dargestellt.

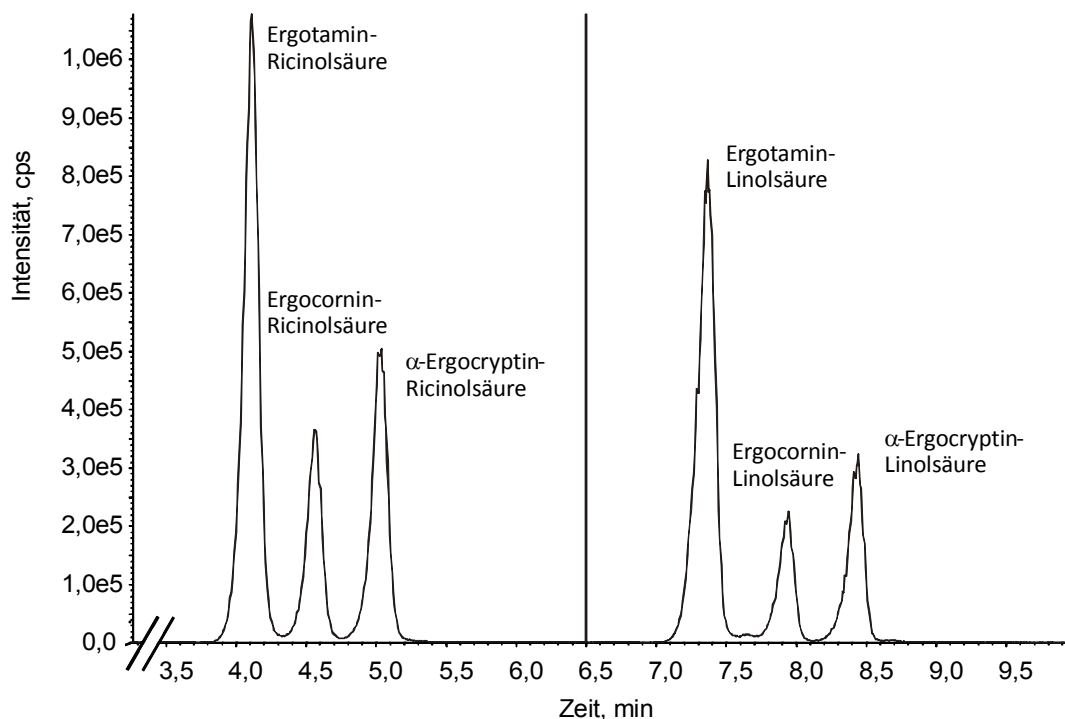


Abbildung 37: Totalionenchromatogramm (TIC) der synthetisierten Ergotalkaloid-Fettsäure-Konjugate (die Messung erfolgte in zwei Zeitfenstern).

In den Sklerotien konnten sowohl die Linolsäure- als auch die Ricinolsäure-Ergotalkaloid-Konjugate nachgewiesen werden. In Abbildung 38 sind beispielhaft die MRM-Chromatogramme des Ergotamin-Linolsäure-Konjugats dargestellt.

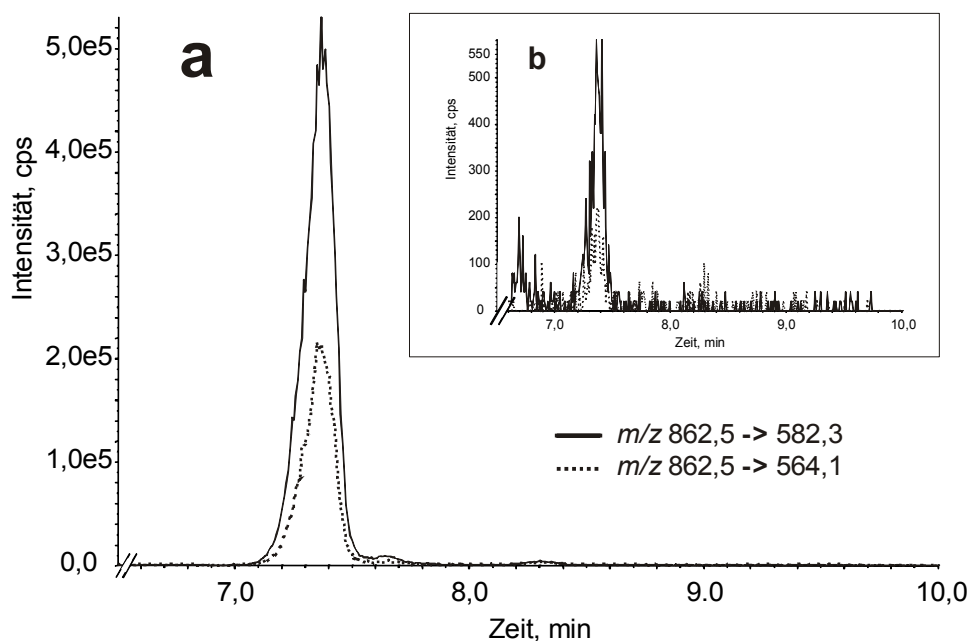


Abbildung 38: Darstellung der zwei intensivsten MRM Übergänge des Ergotamin-Linolsäure-Konjugats von (a) synthetisiertem Standard und (b) in Sklerotienextrakt.

Der Nachweis der Ergotalkloid-Fettsäure-Konjugate in dunkel gelagerten Sklerotien zeigt, dass die Bildung der Abbauprodukte schon auf dem Feld bzw. bei der Lagerung nach der Ernte entstanden sein muss. Zudem müssen zur Bildung der Konjugate neben den Ergotalkaloiden auch freie Fettsäuren in den Sklerotien vorhanden sein. Vor allem der Nachweis der Ergotalkaloid-Ricinolsäure-Konjugate ist überraschend, da von Morris *et al.* [114] berichtet wurde, dass die Ricinolsäure nicht als freie Fettsäure vorliegt, sondern immer an ihrer OH-Gruppe mit anderen Fettsäuren verestert ist. Auch wenn in Ermangelung einer ausreichend charakterisierten Standardsubstanz eine Quantifizierung nicht möglich war, kann davon ausgegangen werden, dass aufgrund der geringen Signalintensitäten die Ergotalkaloid-Fettsäure-Konjugate nur in kleinen Mengen in den analysierten Sklerotien vorhanden waren.

5.4.2.3 Zeitreihe nach Bestrahlung mit UV-Licht

Zur Überprüfung, ob die Bildung der Ergotalkaloid-Fettsäure-Konjugate im Labor nachvollzogen werden kann, wurde Sklerotienmehl in einer Zeitreihe (0, 1, 2, 3, 4 und 5 Stunden) mit UV-Licht ($\lambda = 350 \text{ nm}$) bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurde das Sklerotienmehl extrahiert und mittels HPLC-MS/MS analysiert.

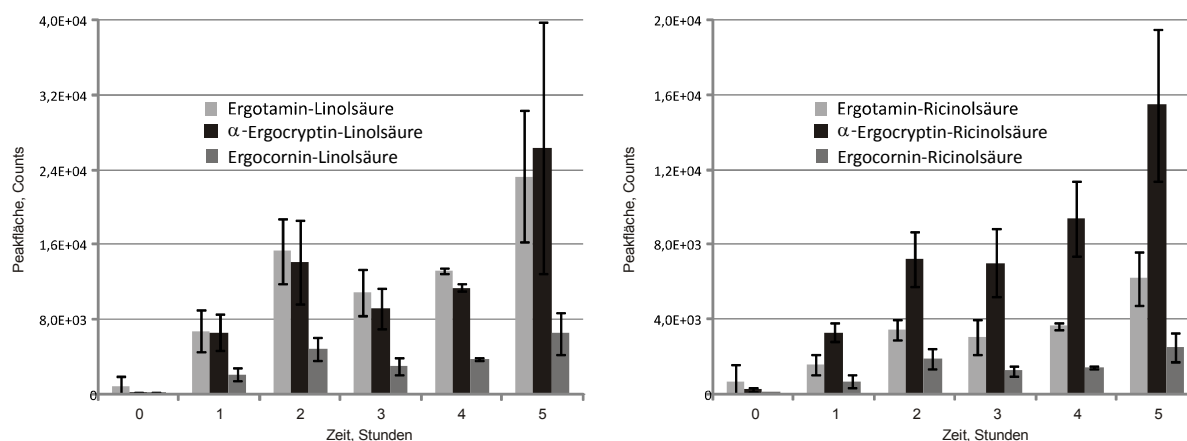


Abbildung 39: Peakflächen der Ergotalkaloid-Linolsäure- bzw. Ergotalkaloid-Ricinolsäure-Konjugate in Sklerotienmehlextrakten nach 0 - 5 Stunden UV-Bestrahlung von Sklerotienmehl (n = 3).

Wie Abbildung 39 zeigt, sind die Intensitäten aller untersuchten Ergotalkaloid-Fettsäure-Konjugate schon nach einer Stunde deutlich angestiegen. Dieses verdeutlicht, dass die Reaktion zur Bildung dieser Verbindungen in Sklerotien möglich ist und schon nach kurzer Bestrahlungszeit eine deutliche Steigerung der nachweisbaren Mengen beobachtet wird.

Es ist das erste Mal, dass Ergotalkaloid-Fettsäure-Konjugate beschrieben wurden. Die photochemische Bildung konnte nachvollzogen werden und die Charakterisierung der Substanzen ist erfolgt. Mit Hilfe der entwickelten HPLC-MS/MS-Methode konnten die Ergotalkaloid-Fettsäure-Konjugate in Realproben, d.h. in dunkel gelagerten Sklerotien, nachgewiesen werden. Damit spielen derartige Abbauverbindungen auch für die Ergotalkaloidanalytik eine Rolle, da diese Analyten real existierende Abbauverbindungen darstellten. Die hier beispielhaft beschriebenen Verbindungen sind nur eine kleine Auswahl möglicher Kombinationen aus Ergotalkaloiden und Fettsäuren bzw. nukleophilen Substanzen. Damit kann, auch bei geringen Gehalten von einzelnen Substanzen, die Summe aller Verbindungen zu einer hohen Belastung des Lebensmittels führen. Dadurch, dass diese Abbauverbindungen noch nicht beschrieben wurden, können keine Aussagen hinsichtlich der Toxikologie getroffen werden.

5.5 Strukturelle Charakterisierung

Zur strukturellen Charakterisierung von Ergotalkaloiden wurden Kristalle der Verbindungen Ergometrinin [97], Ergotaminin [99], Lysergol [100] und LEM [110] gezüchtet und diese mit Hilfe der Einkristallröntgenstrukturanalyse gemessen.

5.5.1 Kristallstrukturen von Ergometrinin und Ergotaminin

Da es bisher nur wenige Kristallstrukturen der Ergotalkaloide gibt, insbesondere für die C8-(*S*)-konfigurierten Verbindungen, wurden von Ergotaminin und Ergometrinin Kristalle gezüchtet. Beide Verbindungen zeigen eine intramolekulare N-H \cdots N-Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem N6-Stickstoffatom im D-Ring des Ergolin-Grundgerüsts (Abbildung 3) und dem Amid-Stickstoffatom. Durch die intramolekulare Wechselwirkung ist keine Koordination von Lösungsmittel bzw. von anderen Ionen mehr möglich, was im Umkehrschluss erklärt, dass die C8-(*S*)-konfigurierten Ergotalkaloide lösungsmittel-frei kristallisieren.

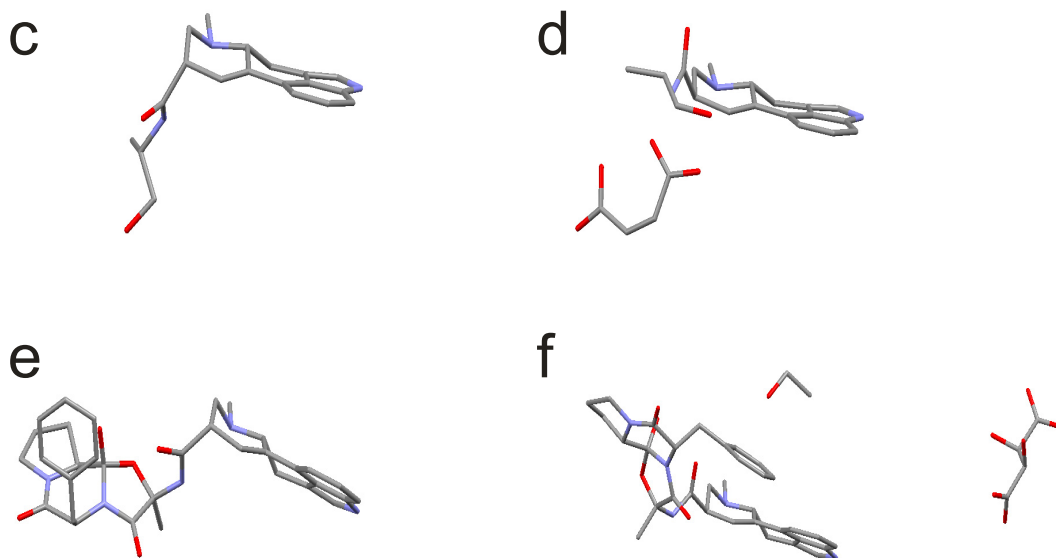


Abbildung 40: Kristallstrukturen von **c** Ergometrinin [97], **d** Ergometrin-Maleat [71], **e** Ergotaminin [99] und **f** Ergotamin-Tartrat-(bis)-Ethanol-Solvat [67]

Anhand der Kristallstrukturen der C8-(*S*)-konfigurierten Ergotalkaloide Ergometrinin **c** und Ergotaminin **e** ist ein Vergleich mit den bereits bekannten Strukturen der C8-(*R*)-

konfigurierten Ergotalkaloide **d** und **f** möglich (Abbildung 40). Auffällig sind die Unterschiede der Torsionswinkel am C8-Atom (Atome C_{Amid}-C8-C9-C10, Abbildung 3). Hier ist zu erkennen, dass der Torsionswinkel bei den (*R*)-konfigurierten Verbindungen größer ist (**d** Ergometrin-Maleat: -125,9°, **f** Ergotamin-Tartrat-(bis)-Ethanol-Solvat -147,0°) als bei den (*S*)-konfigurierten Ergotalkaloiden (**c** Ergometrinin: 113,1°, **e** Ergotaminin: 113,2°). Die (*S*)-konfigurierten Ergotalkaloide zeigen daher eher eine gewinkelte Struktur. Diese deutlichen strukturellen Unterschiede liefern eine mögliche Erklärung dafür, dass die (*S*)-konfigurierten Ergotalkaloide biologisch nicht aktiv sind. Dadurch, dass die Moleküle beider Epimere unterschiedlich gewinkelt sind, kann eine Wechselwirkung der (*S*)-Epimere mit den jeweiligen Rezeptoren der Neurotransmitter womöglich nicht mehr stattfinden - die strukturelle Verwandtschaft zu den Neurotransmittern Dopamin, Noradrenalin und Serotonin (Abbildung 4) [13] ist bei den C8-(*S*)-konfigurierten Ergotalkaloiden nach dieser Hypothese nicht mehr gegeben. Die Kristallstrukturen können jedoch von den Strukturen der Ergotalkaloide in biologischen Systemen, dass heißt von Ergotalkaloiden in Lösung, abweichen und zeigen daher nur eine mögliche Struktur.

Durch den Vergleich der Kristallstrukturen von Ergometrin-Maleat [71] und Ergometrinin [97] war es möglich, eine Erklärung für den hohen Epimerenüberschuss bei der Bildung von 10-(*S*)-LEM zu finden (Abschnitt 5.4.1.1).

5.5.2 Kristallstruktur von Lysergolmonohydrat

Für das Clavin Ergotalkaloid Lysergol, das in den Samen von verschiedenen Pflanzenspezies der Gattung *Ipomoea* zu finden ist (Abschnitt 1.1), konnte eine Kristallstruktur erhalten werden. Auch hier wird, wie bei durch den Pilz *C. purpurea* gebildeten C8-(*R*)-konfigurierten Ergotalkaloiden, Lösungsmittel (Wasser) über eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem N6-Stickstoffatom koordiniert und in die Kristallstruktur integriert.

6 Zusammenfassung

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde ein neues Analysenverfahren zur epimerenspezifischen Quantifizierung von Ergotalkaloiden entwickelt und zum Patent angemeldet [105]. Mit Hilfe dieses HPLC-FLD basierten Analysenverfahrens konnte die Epimerisierung der Ergotalkaloide im Vergleich zu bisher bekannten Verfahrensweisen minimiert werden. Dieses gelang durch den Verzicht des Zusatzes von starken Säuren oder Basen während der gesamten Probenvorbereitung. Hierfür wurden das Epimerisierungsverhalten und die Lage der Epimerengleichgewichte in verschiedenen Lösungsmittelgemischen untersucht. Zudem ist es möglich, die nach der Probenvorbereitung erhaltenen Messlösungen über einen Zeitraum von 96 Stunden bei Raumtemperatur zu lagern, ohne dass eine Epimerisierung zu beobachten ist. Dadurch wird die Gefahr, verfälschte Analysenergebnisse zu erhalten, minimiert - das Verhältnis zwischen den C8-(*R*)- und C8-(*S*)-Epimeren kann, so wie es in der ursprünglichen Probe vorlag, bestimmt werden. Das entwickelte Analysenverfahren arbeitet über eine Festphasenextraktion, was eine schnelle Probenvorbereitung, eine einfache Handhabung und eine zukünftige Automatisierung ermöglicht. Die in dieser Arbeit bestimmten Ergotalkaloidgehalte in Roggenmehl waren im Vergleich zu den in der Literatur genannten Gehalten vergangener Jahre gering. In Weizenkeimöl, in dem erstmals der Ergotalkaloidgehalt quantifiziert wurde, konnten ebenfalls nur geringe Mengen an Ergotalkaloiden nachgewiesen werden, was vor dem Hintergrund der geringen Ergotalkaloidgehalte in Roggenmehl, ein saisonaler Effekt sein könnte. Zur Einordnung der Ergotalkaloidgehalte in Weizenkeimöl sollten die Analysen mit Weizenkeimöl zukünftiger Erntejahre wiederholt werden. Das Analysenverfahren wurde für die Matrices Roggenmehl und Weizenkeimöl bereits validiert. Hier bietet sich eine Ausweitung auf andere relevante Matrices, wie beispielsweise Weizenmehl oder Backwaren, an, um das Analysenverfahren in Verbindung mit einer Automatisierung als universell in der Ergotalkaloidanalytik zu etablieren.

Im Zweiten Teil der Arbeit wurden das Abbau- und Epimerisierungsverhalten von Ergotalkaloiden bei der Verarbeitung von sklerotienhaltigem Roggenmehl zu Keksen und Brot untersucht. Die Ergebnisse der Back-Experimente zeigen, dass Hitzebehandlung zu einem thermischen Abbau und zu einer Epimerisierung in Richtung der biologisch inaktiven C8-(*S*)-Epimere, also zu einer Detoxifizierung, führt. Zum Epimerisierungs- und Abbauverhalten von Ergotalkaloiden durch den Verdauungsprozess waren bisher keine Daten bekannt. Mit Hilfe eines

in vitro Modells konnte die Epimerisierung im Verdauungstrakt simuliert werden. Es zeigte sich eine Toxifizierung durch Umwandlung der C8-(S)-Epimere in ihre toxikologisch relevanten C8-(R)-Epimere, welche selektiv für die Ergotamin-Ergotalkaloide stattfindet. Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass diese selektive Toxifizierung nur im Darmtrakt zu beobachten ist. Hierbei zeigte sich, dass Galle und Pankreatin auf die unterschiedliche Epimerisierungsrichtung zwischen Ergotamin- und Ergotoxin-Ergotalkaloiden besonderen Einfluss haben. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Analysenverfahren, welche nur die toxikologisch relevanten C8-(R)-Epimere quantifizieren, die Toxizität eines Lebensmittels als zu niedrig bewerten können. Dadurch ergeben sich auch Konsequenzen für einen möglichen Grenzwert, der aufgrund der beschriebenen Toxifizierung nicht nur die toxikologisch relevanten C8-(R)-Epimere sondern auch die biologisch inaktiven C8-(S)-Epimere mit einbeziehen muss. Welches Enzym bzw. welcher Mechanismus hinter dieser selektiven Epimerisierung steht, sollte Gegenstand weiterer Forschung sein.

Abbauprodukte von Ergotalkaloiden verdienen besondere Aufmerksamkeit, da sie eine toxikologische Relevanz besitzen können, aber nicht durch die Ergotalkaloid Analysenverfahren erfasst werden. In dieser Arbeit wurden Ergotalkaloid-Konjugate, welche unter Einfluss von Licht entstehen, untersucht. Lumi-Ergometrin, das aus Wasser und Ergometrin gebildet wird, wurde anhand seiner Kristallstruktur charakterisiert. Zudem wurde ein Mechanismus postuliert, der die Stereoselektivität der Bildung des 10-(S)-Lumi-Ergometrins erklärt. Mit Hilfe einer entwickelten HPLC-MS/MS-Methode wurde diese Ergotalkaloid-Abbauverbindung erstmals in Sklerotien, also einer natürlich gewachsenen Probe, nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass Lumi-Ergometrin schon auf dem Feld gebildet wird. Weitere Experimente zeigten, dass neben Wasser andere nukleophile Substanzen unter Licht mit Ergotalkaloiden reagieren können. Exemplarisch wurden hierfür die in Sklerotien vorhandenen Fettsäuren Ricinol- und Linolsäure mit verschiedenen Ergotalkaloiden zu Konjugationsverbindungen verknüpft. Diese Verbindungen wurden synthetisiert, massenspektrometrisch charakterisiert und konnten mit einer HPLC-MS/MS-Methode in Sklerotien nachgewiesen werden. Da die in dieser Arbeit untersuchten Ergotalkaloid-Konjugate bisher noch nicht in Realproben quantifiziert wurden und daher keine Aussagen zur Belastung von Lebensmitteln getroffen werden können, sollte die Verbesserung der Datenlage Gegenstand weiterer Experimente sein. Hierfür bietet sich die Entwicklung einer HPLC-MS/MS basierten Multitoxin-Methode an. So ist es möglich, neben den beschriebenen Verbindungen eine Vielzahl weiterer Ergotalkaloid-

Konjugate, wie beispielsweise Konjugate mit anderen Fettsäuren, zu quantifizieren. Des Weiteren fehlen bislang Daten bezüglich der Toxikologie, die zeigen würden, welche Auswirkungen derartige Ergotalkaloid-Konjugate für die Gesundheit des Verbrauchers haben.

Literaturverzeichnis

- [1] Krska, R. und Crews, C. (2008): Significance, chemistry and determination of ergot alkaloids: A review, Food Additives and Contaminants (Band 25), Nr. 6, Seite 722-731
- [2] Eadie, M. J. (2003): Convulsive ergotism: epidemics of the serotonin syndrome?, Lancet Neurology (Band 2), Nr. 7, Seite 429-434
- [3] Streller, S. und Roth, K. (2009): Horned rye, Chemie in Unserer Zeit (Band 43), Nr. 5, Seite 272-287
- [4] Kopinski, J. S.; Blaney, B. J.; Murray, S. A. und Downing, J. A. (2008): Effect of feeding sorghum ergot (*Claviceps africana*) to sows during mid-lactation on plasma prolactin and litter performance, Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition (Band 92), Nr. 5, Seite 554-561
- [5] Mantle, P. G. und Waight, E. S. (1968): Dihydroergosine: a New Naturally Occurring Alkaloid from the Sclerotia of *Sphacelia sorghi* (McRae), Nature (Band 218), Seite 581-582
- [6] Kantorova, M.; Kolinska, R.; Pazoutova, S.; Honzatko, A.; Havlicek, V. und Flieger, M. (2002): Ergot alkaloids produced by submerged cultures of *Claviceps zizaniae*, Journal of Natural Products (Band 65), Nr. 7, Seite 1039-1040
- [7] Amorprats, D. und Harborne, J. B. (1993): New Sources of Ergoline Alkaloids within the Genus *Ipomoea*, Biochemical Systematics and Ecology (Band 21), Nr. 4, Seite 455-462
- [8] Flieger, M.; Wurst, M. und Shelby, R. (1997): Ergot alkaloids - Sources, structures and analytical methods, Folia Microbiologica (Band 42), Nr. 1, Seite 3-29
- [9] Stoll, A.; Hofmann, A. und Petrzilka, T. (1951): Über Mutterkornalkaloide. 24. Die Konstitution der Mutterkornalkaloide - Struktur des Peptidteils. III., Helvetica Chimica Acta (Band 34), Nr. 5, Seite 1544-1576
- [10] Komarova, E. L. und Tolkachev, O. N. (2001): The chemistry of peptide ergot alkaloids. Part 1. Classification and chemistry of ergot peptides, Pharmaceutical Chemistry Journal (Band 35), Nr. 9, Seite 37-45

- [11] Pierri, L.; Pitman, I. H.; Rae, I. D.; Winkler, D. A. und Andrews, P. R. (1982): Conformational Analysis of the Ergot Alkaloids Ergotamine and Ergotamine, Journal of Medicinal Chemistry (Band 25), Nr. 8, Seite 937-942
- [12] Haarmann, T.; Rolke, Y.; Giesbert, S. und Tudzynski, P. (2009): Ergot: from witchcraft to biotechnology, Molecular Plant Pathology (Band 10), Nr. 4, Seite 563-577
- [13] Schiff, P. L. (2006): Ergot and its alkaloids, American Journal of Pharmaceutical Education (Band 70), Nr. 5, Seite 1-10
- [14] Lee, M. R. (2009): The history of ergot of rye (*Claviceps purpurea*) I: From antiquity to 1900, Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh (Band 39), Nr. 2, Seite 179-184
- [15] Lee, M. R. (2009): The history of ergot of rye (*Claviceps purpurea*) II: 1900-1940, Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh (Band 39), Nr. 4, Seite 365-369
- [16] Giebelmann, R. (2002): Adam Lonitzer (1527-1586) - Arzt und Botaniker, Toxchem und Krimtech (Band 69), Nr. 1, Seite 30-31
- [17] Bundesinstitut für Risikobewertung (2004): Mutterkornalkaloide in Roggenmehl, Stellungnahme des BfR vom 22. Januar 2004
- [18] Dusemund, B.; Altmann, H.-J. und Lampen, A. (2006): II. Toxikologische Bewertung Mutterkornalkaloid-kontaminierter Roggenmehle, Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (Band 1), Seite 150-152
- [19] Negativ-Monographie des BfArM (1986): *Secale Cornutum* - Mutterkorn, Bundesanzeiger Nr. 173 vom 18.09.1986
- [20] Kommentar des Europäischen Arzneibuches (2002) Verlagsgesellschaft Stuttgart
- [21] Rote Liste (2003) Arzneimittelverzeichnis für Deutschland, Editio Cantor Verlag
- [22] Mutschler, E. (2008): Mutschler Arzneimittelwirkungen Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, 9., völlig neu bearbeitete und erweiterte Auflage. Auflage, Geisslinger, Gerd; Kroemer, Heyo K.; Ruth, Peter und Schäfer-Korting, Monika, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart

- [23] Hollingsworth, M.; Edwards, D. und Miller, M. (1988): Ergometrine - a partial agonist at 5-HT receptors in the uterus isolated from the estrogen-primed rat, *European Journal of Pharmacology* (Band 158), Nr. 1-2, Seite 79-84
- [24] Berde, B. und Stürmer, E. (1978): Introduction to the pharmacology of ergot alkaloids and related compounds, Berde, B. und Schild, H. O., *Ergot Alkaloids and Related Compounds* Seite 1-28, Springer, Berlin, Heidelberg, New York
- [25] Mulac, D. und Humpf, H. U. (2011): Cytotoxicity and accumulation of ergot alkaloids in human primary cells, *Toxicology* (Band 282), Nr. 3, Seite 112-121
- [26] Mulac, D.; Hüwel, S.; Galla, H.-J. und Humpf, H.-U. (2012): Permeability of ergot alkaloids across the blood–brain barrier in vitro and influence on the barrier integrity, *Molecular Nutrition & Food Research* (Band 56), Seite 475-485
- [27] Stoll, A.; Hofmann, A. und Troxler, F. (1949): Über die Isomerie von Lysergsäure und Isolysergsäure. 14. Mitteilung über Mutterkornalkaloide, *Helvetica Chimica Acta* (Band 32), Nr. 2, Seite 506-521
- [28] Smith, D. J. und Shappell, N. W. (2002): Technical note: Epimerization of ergopeptine alkaloids in organic and aqueous solvents, *Journal of Animal Science* (Band 80), Nr. 6, Seite 1616-1622
- [29] Hafner, M.; Sulyok, M.; Schuhmacher, R.; Crews, C. und Krska, R. (2008): Stability and epimerisation behaviour of ergot alkaloids in various solvents, *World Mycotoxin Journal* (Band 1), Nr. 1, Seite 67-78
- [30] Stoll, A. und Schlientz, W. (1955): Über Belichtungsprodukte von Mutterkornalkaloiden. 39. Mitteilung über Mutterkornalkaloide, *Helvetica Chimica Acta* (Band 38), Nr. 3, Seite 585-594
- [31] Sund, R. B. (1963): A Sensitive Method for Estimation of Ergometrine, Based Upon Serotonin Antagonism on Isolated Rat Uterus, *Acta Pharmacologica Et Toxicologica* (Band 20), Nr. 3, Seite 233-242
- [32] Hellberg, H. (1957): On the Photo-Transformation of Ergot Alkaloids, *Acta Chemica Scandinavica* (Band 11), Nr. 2, Seite 219-229
- [33] Hellberg, H. (1959): On the Photo-Transformation of Ergot Alkaloids III. Two New Lumi-Ergot Alkaloids, *Acta Chemica Scandinavica* (Band 13), Nr. 6, Seite 1106-1108

- [34] Pöhm, M. (1955): Zur Analytik von Lumi-Mutterkornalkaloiden, *Microchimica Acta* (Band 43), Nr. 5-6, Seite 1016-1018
- [35] Bethke, H.; Delz, B. und Stich, K. (1976): Determination of content and purity of ergotamine preparations by means of high-pressure liquid-chromatography, *Journal of Chromatography* (Band 123), Nr. 1, Seite 193-203
- [36] Scholten, A. H. M. T. und Frei, R. W. (1979): Identification of ergot alkaloids with a photo-chemical reaction detector in liquid-chromatography, *Journal of Chromatography* (Band 176), Nr. 3, Seite 349-357
- [37] Jacobs, W. A. und Craig, L. C. (1936): The ergot alkaloids - IX. The structure of lysergic acid, *Journal of Biological Chemistry* (Band 113), Nr. 3, Seite 767-778
- [38] Stoll, A. und Hofmann, A. (1943): Dihydro derivative of natural levorotary ergot alkaloids (9(th) Announcement on ergot alkaloids), *Helvetica Chimica Acta* (Band 26), Seite 2070-2081
- [39] Schlientz, W.; Brunner, R.; Thudium, F. und Hofmann, A. (1961): Eine neue Isomerisierungsreaktion der Mutterkornalkaloide vom Peptidtypus, *Experientia* (Band 17), Nr. 3, Seite 108
- [40] Ott, H.; Hofmann, A. und Frey, A. J. (1966): Acid-Catalyzed Isomerization in the Peptide Part of Ergot Alkaloids, *Journal of the American Chemical Society* (Band 88), Nr. 6, Seite 1251-1256
- [41] Europäische Kommission (2006): Verordnung (EG) 1881/2006 vom 19. Dezember 2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln, *Amtsblatt der Europäischen Union*, L364/5-24
- [42] Europäische Kommission (2000): Verordnung (EG) 824/2000 vom 19. April 2000 über das Verfahren und die Bedingungen für die Übernahme von Getreide durch die Interventionsstellen sowie die Analysemethoden für die Bestimmung der Qualität, *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften*, L100/31-50
- [43] Europäischer Rat (2003): Verordnung (EG) 1784/2003 vom 29. September 2003 über die gemeinsame Marktorganisation für Getreide, *Amtsblatt der Europäischen Union*, L270/78-95
- [44] Europäische Kommission (2005): Verordnung (EG) 1068/2005 vom 6. Juli 2005 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 824/2000 über das Verfahren und die

- Bedingungen für die Übernahme von Getreide durch die Interventionsstellen sowie die Analysemethoden für die Bestimmung der Qualität, Amtsblatt der Europäischen Union, L174/65-68
- [45] Europäische Kommission (2008): Verordnung (EG) 687/2008 vom 18. Juli 2008 über das Verfahren und die Bedingungen für die Übernahme von Getreide durch die Zahlstellen oder Interventionsstellen sowie die Analysemethoden für die Bestimmung der Qualität, Amtsblatt der Europäischen Union, L192/20-48
- [46] Schoch, U. und Schlatter, C. (1985): Gesundheitsrisiken durch Mutterkorn in Getreide, Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene (Band 76), Seite 631-644
- [47] Wolff, J.; Neudecker, C.; Klug, C. und Weber, R. (1988): Chemische und toxicologische Untersuchungen über Mutterkorn in Mehl und Brot, Zeitschrift für Ernährungswissenschaft (Band 27), Nr. 1, Seite 1-22
- [48] FuttmV (1981): Futtermittelverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 24. Mai 2007 (BGBl. I S. 770), die zuletzt durch Artikel 1 der Verordnung vom 21. September 2012 (BGBl. I S. 2064) geändert worden ist
- [49] Europäisches Parlament und Rat (2002): Richtlinie 2002/32/EG vom 7. Mai 2002 über unerwünschte Stoffe in der Tierernährung, Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften, L140/10-21
- [50] (2005): Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on a request from the Commission related to ergot as undesirable substance in animal feed, The EFSA Journal (Band 225), Seite 1-27
- [51] Europäische Kommission (2012): 2012/154/EU Empfehlung vom 15. März 2012 zum Monitoring von Mutterkorn-Alkaloiden in Futtermitteln und Lebensmitteln, Amtsblatt der Europäischen Union, L77/20-21
- [52] Das Eidgenössische Departement des Innern (EDI) (1995): Verordnung des EDI über Fremd- und Inhaltsstoffe in Lebensmitteln (Fremd- und Inhaltsstoffverordnung, FIV), Stand am 7. Mai 2012, Die Bundesbehörden der Schweizerischen Eidgenossenschaft
- [53] Müller, C.; Kemmlin, S.; Klaffke, H.; Krauthaus, W.; Preiss-Weigert, A. und Wittkowski, R. (2009): A basic tool for risk assessment: A new method for the

- analysis of ergot alkaloids in rye and selected rye products, *Molecular Nutrition & Food Research* (Band 53), Nr. 4, Seite 500-507
- [54] Lauber, U.; Schnauffer, R.; Gredziak, M. und Kiesswetter, Y. (2005): Analysis of rye grains and rye meals for ergot alkaloids, *Mycotoxin Research* (Band 21), Nr. 4, Seite 258-262
- [55] Young, J. C. (1981): Variability in the content and composition of alkaloid found in Canadian ergot. 1. rye, *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes* (Band 16), Nr. 1, Seite 83-111
- [56] Young, J. C. (1981): Variability in the content and composition of alkaloid found in Canadian ergot. 2. wheat, *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes* (Band 16), Nr. 4, Seite 381-393
- [57] Young, J. C. und Chen, Z. J. (1982): Variability in the content and composition of alkaloid found in Canadian ergot. 3. triticale and barley, *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes* (Band 17), Nr. 2, Seite 93-107
- [58] Crews, C.; Anderson, W. A. C.; Rees, G. und Krska, R. (2009): Ergot alkaloids in some rye-based UK cereal products, *Food Additives & Contaminants Part B-Surveillance* (Band 2), Nr. 1, Seite 79-85
- [59] Scott, P. M. und Lawrence, G. A. (1982): Losses of Ergot Alkaloids during Making of Bread and Pancakes, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Band 30), Nr. 3, Seite 445-450
- [60] Bürk, G.; Hobel, W. und Richt, A. (2006): Ergot alkaloids in cereal products - Results from the Bavarian Health and Food Safety Authority, *Molecular Nutrition & Food Research* (Band 50), Nr. 4-5, Seite 437-442
- [61] Fajardo, J. E.; Dexter, J. E.; Roscoe, M. M. und Nowicki, T. W. (1995): Retention of Ergot Alkaloids in Wheat During Processing, *Cereal Chemistry* (Band 72), Nr. 3, Seite 291-298
- [62] Schwarz, P. B.; Hill, N. S. und Rottinghaus, G. E. (2007): Fate of ergot (*Claviceps purpurea*) alkaloids during malting and brewing, *Journal of the American Society of Brewing Chemists* (Band 65), Nr. 1, Seite 1-8

- [63] Mainka, S.; Dänicke, S.; Ueberschär, K.-H. und Reichenbach, H. G. v. (2005): Zum Einfluss einer hydrothermischen Behandlung auf den Ergotalkaloidgehalt von mutterkornbelastetem Roggen, *Mycotoxin Research* (Band 21), Nr. 2, Seite 116-119
- [64] Young, J. C.; Chen, Z. J. und Marquardt, R. R. (1983): Reduction in Alkaloid Content of Ergot Sclerotia by Chemical and Physical Treatment, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Band 31), Nr. 2, Seite 413-415
- [65] Lampen, A. und Klaffke, H. (2006): "Mutterkornalkaloide in Lebensmitteln" I. Zusammenfassende Darstellung, *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* (Band 1), Nr. 2, Seite 148-149
- [66] Klepetarova, B.; Cejka, J.; Kratochvil, B.; Pakhomova, S.; Cisakova, I.; Cvak, L. und Jegorov, A. (2005): Interesting solvent area in crystal structures of two natural ergot alkaloids, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* (Band 70), Nr. 1, Seite 41-50
- [67] Pakhomova, S.; Ondracek, J.; Husak, M.; Kratochvil, B.; Jegorov, A. und Stuchlik, J. (1995): Ergotamin tartrat bis(ethanol) solvate, *Acta Crystallographica Section C- Crystal Structure Communications* (Band 51), Seite 308-311
- [68] Pakhomova, S.; Ondracek, J.; Husak, M.; Kratochvil, B.; Jegorov, A.; Cvak, L.; Sedmera, P. und Havlicek, V. (1997): Conformation of ergopeptam and ergopeptine alkaloids (ergocristam and ergocristine), *Zeitschrift für Kristallographie* (Band 212), Nr. 8, Seite 593-600
- [69] Husak, M.; Kratochvil, B. und Jegorov, A. (1998): Crystal structure of ergometrine ethyl acetate solvate (2 : 1), $(C_{19}H_{23}N_3O_2)(2)(C_4H_8O_2)$, *Zeitschrift für Kristallographie* (Band 213), Nr. 1, Seite 195-196
- [70] Pakhomova, S.; Ondracek, J.; Kratochvil, B. und Jegorov, A. (1996): Crystal structure of 12'-hydroxy-2'-methyl-3',6',18'-trioxo-5'a-(phenyl-methyl)ergotamaniumtartrate bis(methanol) solvate, $C_{37}H_{46}N_5O_{10}$, *Zeitschrift für Kristallographie* (Band 211), Nr. 8, Seite 555-556
- [71] Cejka, J.; Husak, M.; Kratochvil, B.; Jegorov, A. und Cvak, L. (1996): Crystal structures of ergot alkaloid derivatives. Ergometrine maleate and methylergometrine maleate, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* (Band 61), Nr. 9, Seite 1396-1404

- [72] Cvak, L.; Jegorov, A.; Sedmera, P.; Cisarova, I.; Cejka, J.; Kratochvil, B. und Pakhomova, S. (2005): Norleucine, a natural occurrence in a novel ergot alkaloid gamma-ergokryptinine, *Amino Acids* (Band 29), Nr. 2, Seite 145-150
- [73] Scott, P. M. und Lawrence, G. A. (1980): Analysis of Ergot Alkaloids in Flour, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Band 28), Nr. 6, Seite 1258-1261
- [74] Bockhorn, I. und Drinda, H. (2004): Untersuchung von Mutterkornalkaloiden mit LC MS/MS in Getreideprodukten des Handels, *Mykotoxin-Workshop*, 51, 17.-19.05.2004
- [75] Krska, R.; Stubbings, G.; Macarthur, R. und Crews, C. (2008): Simultaneous determination of six major ergot alkaloids and their epimers in cereals and foodstuffs by LC-MS-MS, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (Band 391), Nr. 2, Seite 563-576
- [76] Kokkonen, M. und Jestoi, M. (2010): Determination of ergot alkaloids from grains with UPLC-MS/MS, *Journal of Separation Science* (Band 33), Nr. 15, Seite 2322-2327
- [77] Klug, C.; Baltes, W.; Kronert, W. und Weber, R. (1988): A method for the determination of ergot alkaloids in food, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* (Band 186), Nr. 2, Seite 108-113
- [78] Storm, I. D.; Rasmussen, P. H.; Strobel, B. W. und Hansen, H. C. B. (2008): Ergot alkaloids in rye flour determined by solid-phase cation-exchange and high-pressure liquid chromatography with fluorescence detection, *Food Additives and Contaminants* (Band 25), Nr. 3, Seite 338-346
- [79] Curtui, V.; Gassen, C.; Dewenter, L.; Schneider, E. und Usleber, E. (2007): Forschungsprojekt 03HS019 "Immunochemische Nachweisverfahren für Mutterkornalkaloide"
- [80] Di Mavungu, J. D.; Malysheva, S. V.; Sanders, M.; Larionova, D.; Robbens, J.; Durubel, P.; Van Petgehem, C. und De Saeger, S. (2012): Development and validation of a new LC-MS/MS method for the simultaneous determination of six major ergot alkaloids and their corresponding epimers. Application to some food and feed commodities, *Food Chemistry* (Band 135), Seite 292-303
- [81] Europäische Kommission (2006): Verordnung (EG) 401/2006 vom 23. Februar 2006 zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche

Kontrolle des Mykotoxingehalts von Lebensmitteln, Amtsblatt der Europäischen Union, L70/12-34

- [82] Rychlik, M. und Asam, S. (2008): Stable isotope dilution assays in mycotoxin analysis, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (Band 390), Nr. 2, Seite 617-628
- [83] Krone, S. (2009): Die Bedeutung Einer Gesunden Ernährung Im Kindes- und Jugendalter, GRIN Verlag, München, ISBN: 9783640436071
- [84] Hebammenverband, D. (2012): Praxisbuch: Besondere Stillsituationen, Georg Thieme Verlag, Berlin, ISBN: 9783830455301
- [85] Grubbs, F. E. (1969): Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples, *Technometrics* (Band 11), Nr. 1, Seite 1-21
- [86] von Neumann, J.; Kent, R. H.; Bellinson, H. R. und Hart, B. I. (1941): The mean square successive difference, *Annals of Mathematical Statistics* (Band 12), Seite 153-162
- [87] DIN ISO 5725 (2002): Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen, Beuth Verlag
- [88] Müller, C.; Klaffke, H. S.; Krauthause, W. und Wittkowski, R. (2006): Determination of ergot alkaloids in rye and rye flour, *Mycotoxin Research* (Band 22), Nr. 4, Seite 197-200
- [89] Arribas-Lorenzo, G.; Fogliano, V. und Morales, F. J. (2009): Acrylamide formation in a cookie system as influenced by the oil phenol profile and degree of oxidation, *European Food Research and Technology* (Band 229), Nr. 1, Seite 63-72
- [90] Oomen, A. G.; Rempelberg, C. J. M.; Bruil, M. A.; Dobbe, C. J. G.; Pereboom, D. und Sips, A. (2003): Development of an in vitro digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* (Band 44), Nr. 3, Seite 281-287
- [91] DIN 19738 (2004): Bodenbeschaffenheit - Resorptionsverfügbarkeit von organischen und anorganischen Schadstoffen aus kontaminiertem Bodenmaterial, Beuth Verlag
- [92] Bruker (2001): SMART, SAINT and SADABS Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA
- [93] Sheldrick, G. M. (2008): A short history of SHELX, *Acta Crystallographica Section A* (Band 64), Seite 112-122

- [94] Enraf-Nonius (1989): CAD-4 Software, E.-N., Delft, Niederlande
- [95] Dräger, M. und Gattow, G. (1971): Kristallographische Computer-Programme für die CDC-300, *Acta Chemica Scandinavica* (Band 25), Nr. 2, Seite 761-762
- [96] Altomare, A.; Burla, M. C.; Camalli, M.; Cascarano, G. L.; Giacovazzo, C.; Guagliardi, A.; Moliterni, A. G. G.; Polidori, G. und Spagna, R. (1999): SIR97: a new tool for crystal structure determination and refinement, *Journal of Applied Crystallography* (Band 32), Seite 115-119
- [97] Merkel, S.; Köppen, R.; Koch, M.; Emmerling, F. und Nehls, I. (2010): Ergometrinine, *Acta Crystallographica Section E-Structure Reports Online* (Band 66), Seite o2275
- [98] Stoll, A. (1945): Über Ergotamin. (10. Mitteilung über Mutterkornalkaloide), *Helvetica Chimica Acta* (Band 28), Nr. 6, Seite 1283-1308
- [99] Merkel, S.; Köppen, R.; Koch, M.; Emmerling, F. und Nehls, I. (2012): Ergotaminine, *Acta Crystallographica Section E-Structure Reports Online* (Band 68), Seite o610-o611
- [100] Merkel, S.; Köppen, R.; Koch, M.; Emmerling, F. und Nehls, I. (2012): Lysergol monohydrate, *Acta Crystallographica Section E-Structure Reports Online* (Band 68), Seite o523
- [101] Franzmann, C.; Wachter, J.; Dittmer, N. und Humpf, H. U. (2010): Ricinoleic Acid as a Marker for Ergot Impurities in Rye and Rye Products, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Band 58), Nr. 7, Seite 4223-4229
- [102] Weber, M. und Meyer, H. (2005): ZIBgridfree - Adaptive conformation analysis with qualified support of transition states and thermodynamic weights, ZUSE Institute, Berlin
- [103] Ware, G. M.; Price, G.; Carter, L. und Eitenmiller, R. R. (2000): Liquid chromatographic preparative method for isolating ergot alkaloids, using a particle-loaded membrane extracting disk, *Journal of Aoac International* (Band 83), Nr. 6, Seite 1395-1399
- [104] Technische Regel L 15.01/02-5:2012-01 (2012): Untersuchung von Lebensmitteln - Bestimmung von Ergotalkaloiden in Roggen und Weizen. HPLC-Verfahren mit Reinigung an einer basischen Aluminiumoxid-Festphase, Beuth Verlag

- [105] Merkel, S.; Köppen, R. und Koch, M. (05.11.2010): Analysenverfahren zur Isolierung von Mykotoxinen mit einer Ergolin-Grundstruktur, insbesondere von Ergotalkaloiden, Germany, Patent DE 10 2010 060 382.1
- [106] Barnes, P. J. (1982): Lipid Composition of Wheat Germ and Wheat Germ Oil, *Fette Seifen Anstrichmittel* (Band 84), Nr. 7, Seite 256-269
- [107] Zeisel, S. H.; Mar, M. H.; Howe, J. C. und Holden, J. M. (2003): Concentrations of choline-containing compounds and betaine in common foods, *Journal of Nutrition* (Band 133), Nr. 5, Seite 1302-1307
- [108] Gross, R. W. und Sobel, B. E. (1980): Isocratic high-performance liquid-chromatography separation of phosphoglycerides and lysophosphoglycerides, *Journal of Chromatography* (Band 197), Nr. 1, Seite 79-85
- [109] Merkel, S.; Dib, B.; Maul, R.; Köppen, R.; Koch, M. und Nehls, I. (2012): Degradation and epimerization of ergot alkaloids after baking and in vitro digestion, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (Band 404), Nr. 8, Seite 2489-2497
- [110] Merkel, S.; Köppen, R.; Koch, M.; Emmerling, F. und Nehls, I. (2012): Lumi-ergometrine – structural identification and occurrence in sclerotia, *Mycotoxin Research* (Band 28), Nr. 1, Seite 59-66
- [111] Lehner, A. F.; Craig, M.; Fannin, N.; Bush, L. und Tobin, T. (2004): Fragmentation patterns of selected ergot alkaloids by electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry* (Band 39), Nr. 11, Seite 1275-1286
- [112] Silber, A. und Bischoff, W. (1954): Stability of alkaloid content in various species of ergot., *Die Pharmazie* (Band 9), Nr. 1, Seite 46-61
- [113] Bharucha, K. E. und Gunstone, F. D. (1957): Vegetable Oils. Part VI. The Component Acids of Ergot Oil., *Journal of the Chemical Society*, Seite 610-614
- [114] Morris, L. J. und Hall, S. W. (1965): The structure of the glycerides of ergot oils, *Lipids* (Band 1), Nr. 3, Seite 188-196